

SÉRIE A. N° 3253
N° D'ORDRE :
4125

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean-Marie DUBERT

- 1^{re} THÈSE. — ÉTUDES SUR L'ÉVOLUTION DE LA SPÉCIFICITÉ DES ANTI-CORPS AU COURS DU PHÉNOMÈNE DE RAPPEL.
- 2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 19 Mars 1959 devant la Commission d'examen.

M. R. WURMSER..... *Président.*
Mlle E. LE BRETON..... } *Examineurs.*
M. J. TONNELAT..... }

ÉDITIONS CHIRON
PARIS 1959

SÉRIE A. N° 3253

N° D'ORDRE :

4125

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean-Marie DUBERT

1^{re} THÈSE. — ETUDES SUR L'ÉVOLUTION DE LA SPÉCIFICITÉ DES ANTI-CORPS AU COURS DU PHÉNOMÈNE DE RAPPEL.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 19 Mars 1959 devant la Commission d'examen.

M. R. WURMSER.....

Président.

Mlle E. LE BRETON

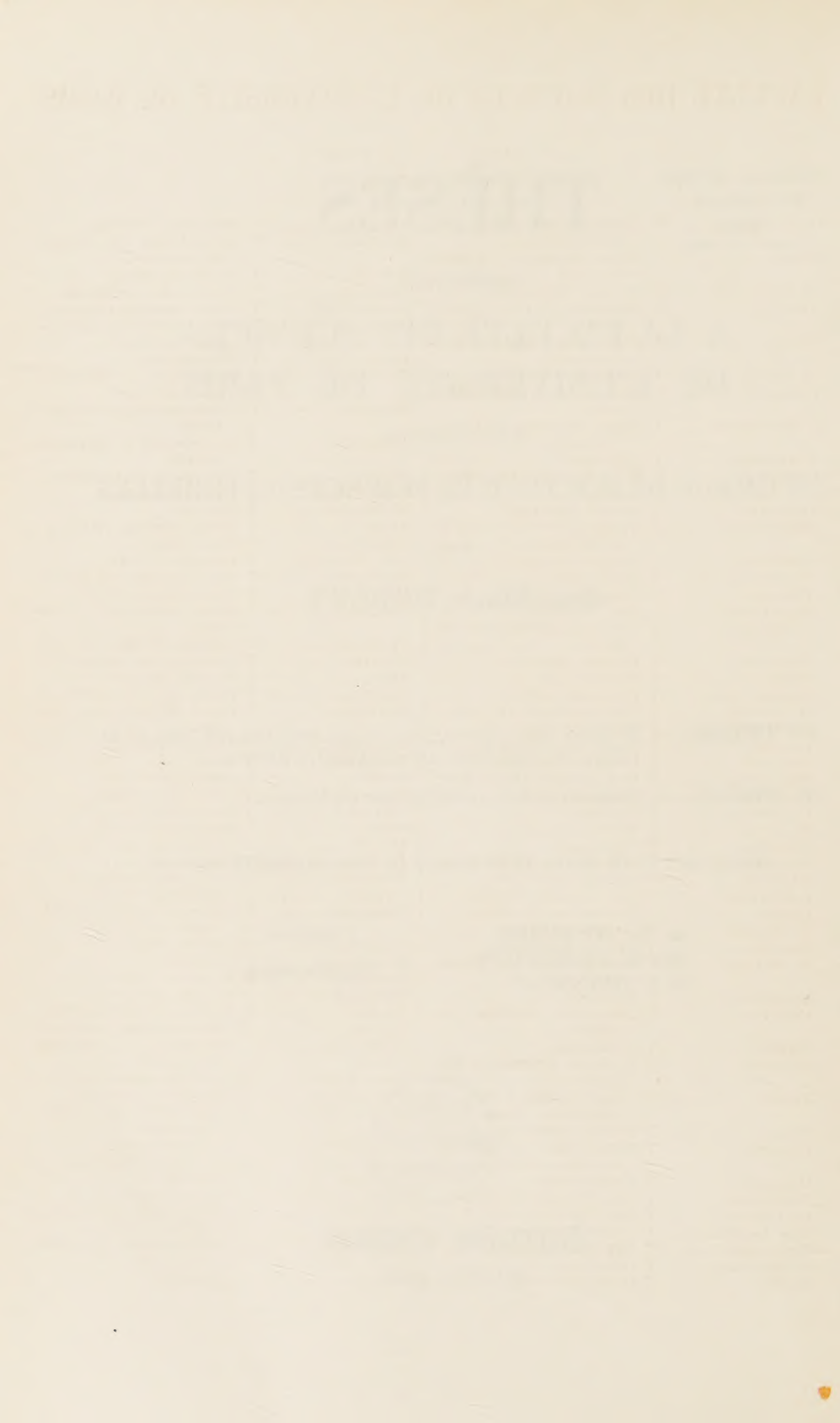
M. J. TONNELAT.....

} *Examineurs.*



ÉDITIONS CHIRON

PARIS 1959



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... J. PERES

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PONCIN.	T Mécanique Générale.
FOCH	T Mécan. physique et expérimentale.	DUBREIL.	T Arithmétique et théorie des nombres.
DE BROGLIE.	T Théories physiques.	QUELET.	T Chimie organique.
PRENANT.	T Anatomie et Histol. comparées.	CAGNIARD.	T Géophysique appliquée.
PERES	T Mécan. des Fluides et applications.	CHAMPETIER.	T Chimie macromoléculaire.
M. CURIE	T Physique (S.P.C.N.).	CUVILLIER.	T Géol. structurale et Géologie appliquée.
BARRABÉ.	T Géol. struct. et Géol. appliquée.	JUNG.	T Pétrographie.
J. BOURCART.	T Géogr. physique et Géol. dynamique.	TRILLAT.	T Microscopie et diffraction électronique.
PLANTEFOL.	T Botanique.	WIEMANN.	T Chimie organique et structurale.
GRASSÉ	T Évolution des êtres organisés.	JACQUINOT.	T Spectroscopie et physique céleste.
PRÉVOST	T Chimie organique.	VASSY.	T Physique de l'Atmosphère.
BOULIGAND.	T Application de l'analyse à la Géométrie.	DESTOUCHES.	T Théories physiques.
CHAUDRON.	T Chimie appliquée.	M. PRUVOST.	T Géologie.
WYART.	T Minéralogie.	AMIEL.	T Chimie générale (P.C.B.).
TEISSIER.	T Zoologie.	HOCART.	T Minéralogie.
MANGENOT	T Biol. Végétale.	J.-P. MATHIEU.	T Physique (P.C.B.).
P. AUGER.	T Physique quantique et relativité.	COUTEAUX.	T Biol. Animale (P.C.B.).
MONNIER.	T Physiol. générale.	MAY	T Biol. Animale (P.C.B.).
PIVETEAU.	T Paléontologie.	CHOQUET.	T Calcul différentiel et intégral.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	FELDMANN.	T Biologie (P.C.B.).
H. CARTAN.	T Mathématiques (E.N.S.).	GUINIER.	T Physique des solides.
LAFFITTE.	T Chimie générale.	JOST.	T Physiol. comparée.
FAVARD.	T Géométrie supérieure.	FORTET.	T Calcul des Probabilités.
COULOMB.	T Physique du Globe.	SCHWARTZ.	T Calcul différentiel et Intégral.
Mlle COUSIN.	T Biol. animale (S.P.C.N.).	CHOUARD.	T Physiol. Végétale.
CHRÉTIEN.	T Chimie minérale.	MALAVARD.	T Aviation.
P. DRACH.	T Zoologie.	BRELOT.	T Calcul différentiel.
KASTLER.	T Physique (E.N.S.).	NORMANT.	T Chimie organique.
EPHRUSSI.	T Génétique.	BÉNARD.	T Chimie (P.C.B.).
WURMSER.	T Biologie physico-chimique.	BUVAT.	T Botanique (E.N.S.).
RIVIÈRE.	T Géologie (S.P.C.N.).	DUGUÉ.	T Statistiques mathém.
GAUTHERET.	T Biol. végétale (P.C.B.).	GELOSO.	T Chimie (S.P.C.N.).
LUCAS.	T Recherches physiques.	SOULAIRAC.	T Psychophysiologie.
A. THOMAS.	T Biologie cellulaire.	ULRICH.	T Physiologie Végétale.
ARNULF.	T Optique appliquée.	MARÉCHAL.	T Optique théorique et appliquée.
M. MORAND.	T Enseignement de Physique.	KIRRMANN.	T Théories chimiques.
SOLEILLET.	T Physique.	CHADEFAUD.	T Botanique.
FORTIER.	T Mécanique expérim. des fluides.	DESTRIAU.	T Physique (M.P.C.).
DANJON.	T Astronomie.	Mlle LE BRETON.	T Physiol. générale.
LAPORTE.	T Physique générale et Radioactivité.	SALEM.	T Mathématiques Générales.
JANET.	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	LELONG.	T Mathématiques Générales.
PETIT.	T Biologie maritime.	DEVILLERS.	T Anatomie et Histologie comparées.
QUENEY.	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	EHRESMANN.	T Topologie algébrique.
GALLIEN.	T Embryologie.	FRANÇON.	T Physique (S.P.C.N.).
EICHHORN.	T Biol. Végétale (S.P.C.N.).	GLANGEAUD.	T Géogr. physique et Géol. dynamique.
DE CUGNAC.	T Biol. Végétale (S.P.C.N.).	GODEMENT.	T Mathématiques (M.P.C.).
Mlle CAUCHOIS. ..	T Chimie Physique.	PISOT.	T Calcul des Probabilités.
THELLIER.	T Physique du Globe.	E. ROCH.	T Géologie.
L'HÉRITIER.	T Génétique.	SCHATZMANN.	T Astrophysique.
GRIVET.	T Radio-électricité.	TERMIER.	T Paléontologie stratigraphique.
		ZAMANSKY.	T Mathématiques Générales.
		LENNUIER.	T Physique (M.G.P.).
		RIZET.	T Génétique.

Mme TONNELAT.	T Théories physiques.	CAMUS.	Biol. Vég. (P.C.B.).
DIXMIER.	T Mathématiques (M.P.C.).	CASTAING.	Physique Générale.
SOUGHAY.	T Chimie générale.	CURIEN.	Minéralogie et cristallographie.
AIGRAIN.	T Électrotechnique.	MOYSE.	Physiologie Végétale.
BRUSSET.	Chimie minérale.	NOIROT.	Évolution des êtres organisés.
M. LÉVY.	Physique théorique.	PANNETIER.	Chimie (S.P.C.N.).
LENORMANT.	T Physiologie.	POSSOMPES.	Biologie Animale (P.C.B.).
Mme CHAIX.	Chimie biologique.	PULLMANN.	Chimie Théorique.
Mme HUREL-PY.	Biol. Végétale (P.C.B.).	TEILLAC.	Physique Nucléaire et Radioactivité.
PIAUX.	Chimie (P.C.B.).	TONNELAT.	Biol. physicochimique.
BRUN.	Mécanique expérimentale des fluides.	VILLE.	Économétrie.
LEDERER.	T Chimie des substances organ. naturelles.	WILLEMART.	Chimie (P.C.B.).
Mme DUBREIL. .	T Mathématiques.	DODÉ.	T Chimie.
Mme LELONG. .	T Mathématiques (E.N.S.).	FREYMANN.	T Physique (S.P.C.N.).
BELLAIR.	T Géologie (S.P.C.N.).	GUINOCHE.	T Biol. Végétale (Orsay).
COTTE.	T Physique (M.P.C.).	ROLLET.	T Chimie (P.C.B.).
J.-E. DUBOIS. .	T Chimie (S.P.C.N.).	Mlle JOSIEN.	T Chimie (P.C.B.).
LAMOTTE.	Zoologie (E.N.S.).	CHEVALLEY.	T Géométrie Algébrique et théorie des groupes.
MICHEL (André).	T Chimie (S.P.C.N.).	ARNOULT.	T Physique (Orsay).
OLMER.	T Énergétique Générale.	CHAPELLE.	T Physique (P.C.B.).
ROUAULT.	T Physique Générale.	DELANGE.	T Mathématiques (Orsay).
GAUTHIER.	T Méc. appliquée.	DENY.	T Méc. théor. des Fluides.
BARCHEWITZ. .	Chimie Physique.	G. LUCAS.	T Géologie.
BROSSEL.	Physique atomique.		
BUSER.	Biologie animale (P.C.B.).		

Secrétaire général. C. MONIER

A MON PERE, A MA MERE

A MA FEMME

A M. Rémy LAFABRIE,
Agrégé de Mathématiques,

j'exprime ma gratitude pour son rôle déterminant
dans les débuts de mes études scientifiques.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A LA MEMOIRE DE M. MICHEL MACHEBOËUF,
*Membre de l'Académie Nationale de Médecine,
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris,
Chef de Service à l'Institut Pasteur.*

C'est à son impulsion que je dois mon orientation vers la Biochimie. Je tiens à dire ici l'étendue de la reconnaissance et de la respectueuse affection que je lui garde.

A M. Jacques MONOD,
Chef de Service à l'Institut Pasteur,

je n'exprimerai jamais assez ma reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire. Ses conseils et ses critiques ont été pour moi une aide et un encouragement précieux. Je voudrais qu'il sache également à quel point j'ai apprécié l'atmosphère enthousiaste et amicale qu'il a su créer autour de son attachante personnalité.

A M. B. CINADER, *Ph. D., D. Sc.,*

Le stage que j'ai effectué dans son Laboratoire, au Lister Institute (Londres), me fut particulièrement profitable. Les liens d'amitié qui l'unissaient à la plupart de ses collègues créaient autour de lui une ambiance très vivante et de haute tenue scientifique.

A M. Jacques TREFOUEL,

*Membre de l'Institut
et de l'Académie Nationale de Médecine,
Directeur de l'Institut Pasteur,*

qui en m'accueillant à l'Institut Pasteur, m'a permis de bénéficier de l'atmosphère exceptionnelle de cette grande Maison.

A M. R. WURMSER,

A Mlle E. LE BRETON,

A M. J. TONNELAT,

qui nous ont fait l'honneur d'accepter de faire partie du Jury de cette thèse,

Homage de gratitude.

ABREVIATIONS UTILISEES AU COURS DE CE MEMOIRE

Chapitre II.

- AH Albumine humaine.
AHD Albumine humaine couplée par diazotation à l'acide sulfanilique.
ALD Albumine de lapin couplée par diazotation à l'acide sulfanilique.

Chapitres III et IV.

- AHpS Albumine humaine couplée par diazotation à l'acide sulfanilique.
AHmS Albumine humaine couplée par diazotation à l'acide méthanilique.
AHpAs Albumine humaine couplée par diazotation à l'acide arsénilique.

TpS Composés monoazoïques de la tyrosine et de l'acide sulfanilique.
TmS Composés monoazoïques de la tyrosine et de l'acide méthanilique.
TpAs Composés monoazoïques de la tyrosine et de l'acide arsénilique.

HpS Composés monoazoïques de l'histidine et de l'acide sulfanilique.
HmS Composés monoazoïques de l'histidine et de l'acide méthanilique.

INTRODUCTION

Les anticorps sont des protéines du groupe des globulines qui ont pour caractéristique de se combiner de façon spécifique avec l'antigène correspondant ou avec des substances présentant des motifs structuraux identiques ou très voisins. La combinaison entre l'antigène et l'anticorps est suivie, *in vivo* comme *in vitro*, de phénomènes secondaires qui, selon les conditions, peuvent revêtir des aspects d'une diversité extrême, parfois de caractère spectaculaire.

La première observation de tels phénomènes fut celle de la protection spécifique conférée à l'homme ou à l'animal par un contact préalable avec un agent pathogène atténué. Cette découverte qui fut l'œuvre de *JENNER* et de *PASTEUR* eut un immense retentissement médical. Une nouvelle discipline scientifique était fondée, mais tout n'était encore qu'hypothèse quant au mécanisme de la protection obtenue.

En 1890, *BEHRING* et *KITASATO* mirent en évidence le pouvoir antitoxique de sérums antidiphtériques et antitétaniques ; l'étape suivante fut la définition de la nature protéique des anticorps décelés dans le sérum d'animaux immunisés et l'étude quantitative de leurs réactions avec l'antigène par les méthodes rigoureuses de l'Immunochimie. Cette époque, fondamentale dans le développement de l'Immunologie, fut illustrée en particulier par les travaux de *LANDSTEINER*, *HEIDELBERGER*, *FELTON*... Plus récemment, certains auteurs ont même pu définir les constantes thermodynamiques qui caractérisent la réaction initiale de combinaison entre l'antigène et l'anticorps.

L'immunité humorale n'est pas le seul aspect que peut revêtir la réaction d'un hôte à une substance étrangère et certains états d'immunité peuvent même n'avoir que des manifestations exclusivement

cellulaires. Néanmoins, la formation d'anticorps constitue un phénomène fondamental. Le problème se pose de savoir par quels mécanismes la synthèse d'une protéine spécifique est provoquée par la pénétration dans l'organisme de substances étrangères antigéniques.

Cette biosynthèse de globulines spécifiques provoquée par l'antigène présente avec la biosynthèse induite des enzymes des analogies évidentes, mais aussi des différences qui semblent fondamentales. Cette comparaison tire son principal intérêt de la précision des connaissances acquises dans le domaine de l'induction enzymatique.

La diversité des théories qui ont été proposées pour expliquer la biogénèse des anticorps, reflète la variété des hypothèses qu'elles impliquent nécessairement, tant sur le mécanisme de la biogénèse des protéines que sur les problèmes spécifiquement liés au phénomène immunitaire. Une cause essentielle de ces divergences est l'impossibilité de définir actuellement avec quelque précision, le rôle joué par l'antigène. Pour *PAULING* et *HAUROWITZ*, l'antigène constitue lui-même la matrice au contact de laquelle la molécule de globuline prend, au cours de sa synthèse, l'empreinte spécifique qui la définira comme anticorps. Il ne saurait y avoir de synthèse d'anticorps en l'absence d'antigène. *BURNET* a, au contraire, fait l'hypothèse que la production d'anticorps continue alors que l'antigène a complètement disparu de l'organisme. *PAULING*, *BURNET*, *SCHWEET* et *OWEN*, considèrent que la spécificité des molécules d'anticorps a été introduite dans l'organisme en réponse aux caractéristiques structurales de l'antigène, que cette information soit transmise directement par l'antigène ou secondairement par l'intermédiaire des acides nucléiques. *JERNE* et *TALMAGE* par contre, supposent que toutes les spécificités préexistent dans l'organisme et que la synthèse des globulines qui présentent de l'affinité pour l'antigène est sélectivement favorisée au cours de l'immunisation. Le postulat, sur lequel reposent ces théories, avait déjà été énoncé par *EHRlich* en 1900, puis il avait été écarté comme invraisemblable pendant plus d'un demi-siècle.

Les conditions expérimentales bien définies d'une réaction de rappel m'ont semblé devoir permettre une détermination critique du rôle joué par l'antigène dans ce phénomène. A la suite d'un premier contact avec l'antigène, l'individu acquiert, en quelques jours ou quelques semaines, la propriété de réagir à une nouvelle injection du même antigène par la formation de quantités élevées d'anticorps après une phase de latence courte. Tels sont les deux critères essentiels de la réaction de rappel. Nous nous proposons d'étudier la spécificité des anticorps formés au cours de la réaction de rappel, lorsque l'antigène

injecté secondairement est différent de l'antigène primitivement injecté, bien que présentant avec lui une réaction croisée due à de grandes analogies structurales. Dans quelle mesure l'évolution quantitative et qualitative de la population d'anticorps déclenchée par l'injection de rappel est-elle influencée par la nature particulière de l'antigène actuellement injecté ? L'antigène injecté lors du rappel fournit-il une matrice qui imprime sa spécificité aux nouvelles globulines synthétisées ou bien déclenche-t-il l'expression d'une information structurale acquise au contact du premier antigène injecté ? Ou encore, agit-il en favorisant sélectivement la synthèse des types d'anticorps qui, formés en réponse au premier antigène injecté, auraient une configuration particulièrement adaptée à ce nouvel antigène ? La valeur de la réponse que nous pouvons apporter à ces questions dépend directement de la valeur des méthodes utilisées pour effectuer l'analyse de ces anticorps *in vitro*. La technique d'hémagglutination passive que nous avons tout d'abord utilisée pour détecter différents anticorps antiprotéines nous a permis d'obtenir des résultats dont l'interprétation restait incertaine. Grâce à l'étude des anticorps antihaptènes par la méthode de dialyse à l'équilibre, nous avons été amenés à définir dans une situation très complexe certains aspects critiques de l'évolution de la population d'anticorps au cours du phénomène de rappel.

PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DU PHÉNOMÈNE DE RAPPEL

A la suite d'un premier contact avec un antigène l'organisme acquiert des propriétés spécifiques nouvelles qui se manifestent lors d'un contact ultérieur avec ce même antigène. La réaction de rappel en est une des expressions essentielles. Signalons pour mémoire que si le premier contact avec certaines substances étrangères a eu lieu pendant la vie embryonnaire ou dans les premiers jours après la naissance, il peut conduire au contraire à l'affaiblissement et même à l'abolition de toute réponse immunitaire lorsque l'animal, devenu adulte, sera à nouveau traité avec ce même antigène : c'est le phénomène de tolérance immunitaire acquise.

Le phénomène de rappel domine toute l'étude des processus d'immunisation. Nous nous limiterons à rappeler les caractéristiques essentielles de ce phénomène, en insistant sur les aspects qui concernent particulièrement notre problème.

I - DESCRIPTION DU PHÉNOMÈNE DE RAPPEL

Les caractéristiques de la réaction de rappel apparaissent de façon particulièrement nette lorsque l'on compare, chez le même individu, l'effet de deux injections espacées du même antigène. Dans le cas particulier où l'immunisation antérieure a consisté en une injection unique, la réponse déclenchée par la nouvelle injection d'antigène est appelée aussi «réponse secondaire».

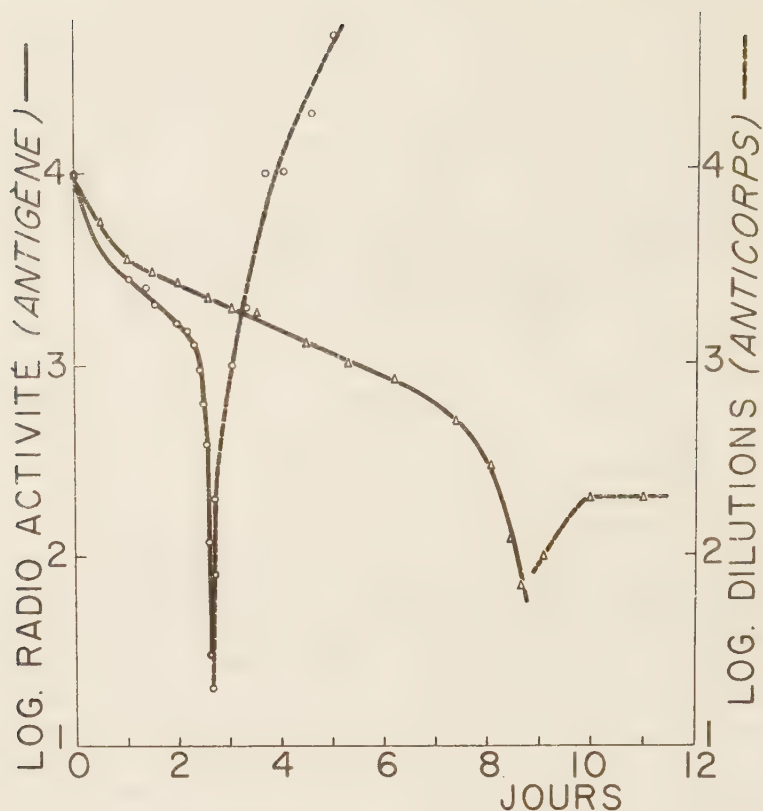


Figure 1. - Elimination de l'antigène (albumine humaine chimiquement couplée à deux atomes d'iode radioactif par molécule, en moyenne) et apparition des anticorps dans le sérum, au cours d'une réponse primaire (Δ) et d'une réponse secondaire ($\circ$). L'origine des abscisses correspond au moment de chacune des injections d'antigène, espacées en fait de quatre semaines. L'animal d'expérience est le Lapin. Le titre des anticorps est exprimé par l'inverse de la dilution maximum donnant encore une hémagglutination passive positive (technique décrite au chapitre II).

Les différences entre les réponses à une injection primaire et à une injection secondaire sont très marquées lorsque l'antigène est une protéine. C'est d'ailleurs à propos de la toxine diphtérique que SOLOMONSEN et MADSEN firent la première observation du phénomène en 1895.

La description de la réaction de rappel peut être faite par exemple à partir des travaux de BURNET (1949) ou de DIXON, MAURER et DEICHMILLER (1954). BURNET a étudié l'effet de deux injections d'anatoxine staphylococcique effectuées à dix huit jours d'intervalle. Après la première injection, aucun anticorps n'est observé avant le

septième jour; le titre maximum est ensuite atteint entre le dixième et le quatorzième jour. L'injection secondaire entraîne, par suite de la combinaison entre l'antigène injecté et l'anticorps circulant, une disparition transitoire des anticorps qui est suivie, dès la quarantième ou la quarante huitième heure d'une augmentation rapide et massive de la quantité d'anticorps. Le maximum est atteint du cinquième au sixième jour. Entre la quarante huitième et la quatre-vingt seizième heure, l'accroissement du titre en fonction du temps est exponentiel, puis il se ralentit avant que le maximum ne soit atteint.

En utilisant des antigènes rendus radioactifs par fixation d'iode 131 , *DIXON*, *MAURER* et *DEICHMILLER* ont pu suivre également dans le sérum la disparition de l'antigène injecté. A la suite de la première injection, l'antigène, une albumine hétérospécifique, se comporte pendant six à huit jours comme une albumine sérique de la même espèce, puis du sixième au neuvième jour on observe l'élimination progressive de cet antigène. Les anticorps apparaissent ensuite et le titre maximum est atteint vers le douzième jour. Après l'injection secondaire, l'antigène est éliminé en moins de quatre jours et du quatrième au sixième jour on assiste à une augmentation très importante de la quantité d'anticorps circulants qui est alors cinq à dix fois supérieure au maximum atteint lors de la réponse primaire.

La figure 1 représente des résultats que nous avons obtenus grâce, en ce qui concerne l'étude de la disparition de l'antigène, à la technique décrite par *DIXON* et *MAURER*. Les deux critères essentiels de la réponse secondaire y sont très apparents. En opposition avec la réponse primaire, des titres élevés sont atteints après une phase de latence brève.

II - CONDITIONS NECESSAIRES A LA MANIFESTATION D'UNE REACTION DE RAPPEL

Une des conditions essentielles pour que se manifeste un effet de rappel est qu'un intervalle de temps suffisant existe entre les stimulations antigéniques successives. Il n'existe pas d'études systématiques de la réponse obtenue en fonction de l'intervalle entre les injections primaires et secondaires. Néanmoins il ressort, en particulier du travail de *GLENNY* et ses collaborateurs, qu'une réponse typique est obtenue si les injections sont espacées de trois à quatre semaines. *BARR* et *GLENNY* (1945) ont observé que la réponse s'accroît si l'intervalle est porté de un à deux ou à trois mois, mais ces résultats ne

semblent pas confirmés. Il est certain, en tous cas, que pour certains antigènes au moins, une injection effectuée des mois ou des années après le premier contact avec l'antigène entraîne une réponse plus rapide et plus forte qu'une même injection faite à un animal non immunisé. Des observations d'ordre épidémiologique semblent traduire des effets de rappel se produisant des dizaines d'années après l'infection primaire (DAVENPORT et collaborateurs, 1953).

Dès 1903, VON DUNGERN avait montré que si la deuxième injection était faite deux jours seulement après la première, elle était sans effet sur la formation ultérieure des précipitines. Il semble qu'un intervalle d'au moins dix à quinze jours soit nécessaire pour obtenir une réaction de rappel. Certains auteurs ont supposé que l'apparition des anticorps, observée précisément dans ce délai, à la suite d'une injection unique d'antigène, serait due en fait à une réaction de rappel causée par les traces d'antigène qui se trouvent encore dans le sang ou dans les tissus à ce moment. HOLT (1949) a observé qu'à la suite d'une injection sous cutanée unique d'anatoxine diphtérique adsorbée sur phosphate d'alumine, les anticorps apparaissent vers le dixième jour; leur titre atteint une valeur maximum du douzième au quatorzième jour et demeure, après une chute rapide, à un niveau faible mais mesurable. Si le nodule formé au site d'injection est excisé entre le septième et le dixième jour, le même plateau est progressivement atteint, mais sans présenter au préalable de maximum.

Certains auteurs ont essayé de mettre en évidence une relation entre la quantité d'antigène injecté et l'intensité des réponses primaires et secondaires (STEVENS, 1956). Il est important de signaler que des quantités d'antigène trop faibles pour déclencher une réaction primaire observable permettent d'obtenir des effets de rappel importants (TO-PLEY, 1930). COHN et PAPPENHEIMER (1949) ont calculé le rapport du nombre de molécules d'anticorps apparues au nombre de molécules d'antigène injectées dans le cas où l'anatoxine diphtérique est injectée en très faible quantité à un sujet présentant une réaction de Schick négative. Le rapport ainsi calculé est de l'ordre de 10^6 au moins.

L'effet de rappel n'est pas limité à une injection secondaire. Une troisième injection effectuée un certain temps après une injection secondaire entraîne une réaction de rappel caractéristique. La phase de latence peut être encore plus brève et les titres d'anticorps encore plus élevés (DIXON et ses collaborateurs, 1954). Cet effet peut être ainsi obtenu plusieurs fois pourvu qu'un intervalle suffisant sépare les injections. En fait, quel que soit le processus d'immunisation, chaque nouvelle injection d'antigène déclenche une réaction qui peut être

considérée comme une réaction de rappel, l'intensité de la réponse dépendant surtout de l'intervalle de temps entre cette injection et l'injection précédente.

Le phénomène de rappel joue donc un rôle essentiel au cours des processus d'immunisation. Il convient cependant d'en limiter la généralité : ce phénomène ne s'observe pas avec tous les antigènes. De très nombreuses observations à ce sujet ont été rassemblées par *BURNET* (1947) et par *DIXON*, *MAURER* et *DEICHMILLER* (1954) en particulier. Pour la plupart des antigènes particuliers, comme les bactéries, les bactériophages, les hématies, il existe généralement peu de différences entre la réponse primaire et la réponse secondaire; dans les deux cas l'apparition des anticorps dans le sérum a lieu après un temps de latence bref, et le titre maximum atteint est élevé: *TOPLEY* (1930) a cependant obtenu avec les bactéries un phénomène qui rappelle la succession des phases primaires et secondaires bien différenciées : l'injection de 10^4 bactéries seulement n'entraîne aucune réponse immunitaire détectable, mais de nouvelles injections espacées de cette même dose entraînent la formation d'anticorps. *TALMAGE*, *FRETER* et *TALIAFERRO* (1956) ont distingué dans les immunsérums de lapin anti hématies de mouton quatre types distincts d'anticorps et ont montré que seuls les anticorps possédant la spécificité Forssman sont responsables de l'accroissement rapide des propriétés spécifiques à la suite d'une injection unique.

Un résultat différent est obtenu avec certains polysaccharides. A la suite d'une injection de polysaccharide de Pneumocoques, le titre des anticorps s'élève très progressivement, se maintient en plateau plusieurs mois puis diminue très lentement. Fait plus caractéristique encore, si, après deux ans, on effectue une nouvelle injection du même polysaccharide, on n'observe aucune élévation du titre des anticorps (*HEIDELBERGER*, *Mc LEOD*, *KAISER*, *ROBINSON*, 1946). *KABAT* (1956) a observé que trois ans après une injection de dextrane à l'homme, la quantité d'anticorps est encore le tiers de la valeur maximum obtenue. Une autre observation vient souligner le comportement atypique de ce groupe d'antigène : c'est celle de l'inhibition spécifique de la réponse immunitaire à la suite de l'injection à un animal adulte d'une quantité de polysaccharides très supérieure à la dose immunisante (*FELTON*, 1949). La persistance pratiquement indéfinie dans les tissus du polysaccharide injecté semble être à l'origine des effets atypiques de cette classe d'antigènes. Les conditions d'une réaction de rappel ne peuvent être ainsi réalisées. Notons que la répétition, à intervalles rapprochés et pendant une période très longue, d'injections de protéines

ou d'hématies hétérospécifiques (*DIXON* et *MAURER*, 1955) (*TALIAFERRO* et *TALIAFERRO*, 1951) entraîne également une abolition élective de la réponse immunitaire qui n'est d'ailleurs, dans ce cas, que temporaire.

Même lorsque les conditions de l'immunisation sont telles qu'un phénomène de rappel peut se manifester, la réponse obtenue est extrêmement variable en fonction non seulement de l'état physiologique de l'animal - en particulier du régime alimentaire et de l'équilibre neuro-hormonal - mais aussi de la constitution génétique de l'individu (*SANG* et *SOBEY*, 1954).

III - TAUX DE SYNTHÈSE DES ANTICORPS

Dans toutes les études que nous venons de discuter, la réponse immunitaire est mesurée par les variations au cours du temps de la quantité des anticorps circulants. Si l'on tient compte simultanément de la période biologique de ces anticorps, on peut en déduire leur vitesse d'apparition dans le sérum. Mais il est clair que la vitesse d'apparition des anticorps circulants présente des rapports indirects, et peut-être variables, avec la vitesse de synthèse réelle des anticorps dans les tissus. Le problème se pose en particulier de savoir si l'on peut considérer la réponse secondaire comme résultant d'une libération d'anticorps préformés ou d'une véritable stimulation des mécanismes de synthèse. Les études effectuées au moyen d'acides aminés radioactifs ont permis un abord direct de ce problème.

Le principe de cette analyse est d'administrer à un animal des acides aminés radioactifs à divers moments au cours de l'immunisation soit avant l'injection de rappel, soit après et, dans ce cas à nouveau, soit pendant la phase de latence apparente, soit au moment où la quantité d'anticorps s'accroît dans le sérum; la radioactivité des anticorps apparus au cours du phénomène de rappel est ensuite mesurée.

Les expériences de *GREEN* et *ANKER* (1954), de *DIXON*, *MAURER*, *WEIGLE* et *DEICHMILLER* (1956), de *HSIEH FU CHENG* et *HAUROWITZ* (1957) aboutissent à certains résultats contradictoires en ce qui concerne non seulement la réaction de rappel proprement dite mais aussi l'importance de la synthèse au cours de la phase de latence. L'interprétation de ces résultats est difficile du fait que les acides aminés incorporés dans les globulines sont en partie réutilisés ultérieurement, après la destruction de ces molécules, pour la synthèse de nouvelles protéines et en particulier des anticorps.

D'autre part, il faut tenir compte de l'inclusion, dans les précipités spécifiques, des anticorps coprécipitants (présents au cours de la réaction de rappel avant les anticorps précipitants), du complément ou d'autres protéines non anticorps (DLIXON, 1957, TALIAFERRO, 1957).

Des résultats très nets ont par contre été obtenus lorsque cette technique isotopique est utilisée conjointement au transfert des cellules d'un individu à un autre (TALIAFERRO et TALMAGE, 1955, STAVITSKY, 1956 et TALIAFERRO et TALIAFERRO, 1957). Les expériences de TALIAFERRO consistent à administrer à un lapin des acides aminés radioactifs aussitôt après une injection de rappel (albumine bovine) et à transférer à un lapin non immunisé des suspensions de cellules de rate prélevées sur l'animal donneur, trois jours après l'injection de rappel. Aucun anticorps précipitant n'est apparu à cette date. Dans les deux jours qui suivent ce transfert, les anticorps apparaissent rapidement dans le sérum de l'animal « receveur ». La radioactivité de ces anticorps est extrêmement faible. Moins de 1 % des anticorps ont incorporé les acides aminés radioactifs présents, avant le transfert, chez l'animal donneur. L'expérience symétrique consiste à administrer l'isotope non plus à l'animal donneur mais à l'animal receveur, aussitôt après le transfert. Dans ces conditions, les anticorps qui apparaissent ont une activité spécifique élevée par rapport à l'activité spécifique des autres protéines sériques du receveur.

Cette étude est une élégante démonstration du fait que les anticorps sont synthétisés « de novo » à partir des acides aminés libres et qu'il n'existe pas de précurseurs polypeptidiques à vie longue des molécules d'anticorps. Ces résultats indiquent aussi que l'étude de la variation des quantités d'anticorps circulants renseigne de façon assez fidèle sur le taux de synthèse de ces anticorps.

Il est un cas cependant où l'élévation du titre des anticorps doit être rattachée à un phénomène de libération. Cette observation est due à DOUGHERTY, CHASE et WHITE (1944). Il importe de décrire cet effet afin de le distinguer nettement du phénomène de rappel. L'injection d'hormones corticosurrénales ou ante hypophysaires à un animal qui a subi auparavant une immunisation prolongée, entraîne une élévation rapide et importante du titre des anticorps circulants. Le titre est maximum six à neuf heures après l'injection d'hormone puis décroît ensuite très rapidement. Il revient à sa valeur précédente en vingt quatre à quarante huit heures, et ceci n'est pas l'aspect le moins étonnant de cette réaction. Ces auteurs observant dans le même temps une lyse intense des centres lymphoïdes concluent que les anticorps apparus dans le sérum à la suite de cette injection, résultent de la libération d'anticorps

préformés, stockés dans les lymphocytes. Il s'agirait d'un phénomène très général qui s'observerait à la suite de diverses « agressions » de l'organisme. De nombreux auteurs cependant n'ont pu confirmer ces observations. *BUSSARD*, *CORVAZIER*, *GRABAR* et *ASCHKENASY* (1950) ont présenté une discussion générale de cet effet, basée sur leurs propres expériences et l'ensemble des résultats publiés à cette date. Ces auteurs ont en particulier calculé la quantité de globulines et d'anticorps qui pouvaient être libérés en supposant une lyse totale des lymphocytes. Il résulte de ce calcul que l'augmentation des γ globulines ou des anticorps par ce mécanisme serait trop faible pour être mesurée par les méthodes de l'Immunochimie quantitative mais que seules des techniques très sensibles, comme l'héماغglutination utilisée par *DOUGHERTY*, sont susceptibles de mettre cet effet en évidence. Il s'agit donc là d'une nouvelle différence essentielle, d'ordre quantitatif, entre le phénomène de rappel et la réaction à une injection de cortisone.

Un argument d'un autre ordre indique que l'élévation de la quantité des anticorps, observée au cours du rappel, est due à une synthèse « de novo » : ces anticorps présenteraient certaines propriétés distinctes de celles des anticorps existant avant cette injection.

IV - EVOLUTION QUALITATIVE DES ANTICORPS EN COURS D'IMMUNISATION

Des différences qualitatives ont été dans quelques cas mises en évidence entre les anticorps obtenus au cours soit d'une réponse primaire, soit d'une réponse secondaire. Cependant à la suite d'une injection unique d'antigène, les anticorps sont souvent en quantité si faible que de nombreuses méthodes analytiques leur sont inapplicables. C'est pourquoi la plupart des travaux ont consisté à comparer les anticorps obtenus à différents moments d'une hyperimmunisation.

Les modifications des propriétés physicochimiques des anticorps constituent un premier aspect de cette évolution. Un exemple classique en est l'apparition, au cours d'une hyperimmunisation avec l'anatoxine diphtérique, d'antitoxines qui ont, non plus la mobilité électrophorétique des γ globulines, mais une mobilité plus élevée (fraction T, *KEKWICK* et *RECORD*, 1941). Par chromatographie de partage, *HUMPHREY* et *PORTER* (1956) ont analysé les γ globulines d'animaux immuns et montré que les anticorps se localisent dans des fractions différentes selon les conditions d'immunisation, et cela pour des antigènes très différents.

Les techniques immunochimiques classiques permettent de mettre en évidence des différences dans la composition du précipité spécifique. Par exemple, le rapport de la quantité d'azote de l'anticorps à la quantité d'azote de l'antigène qui est de cinq environ après une première injection au lapin d'albumine de bœuf, varie de huit à onze après la deuxième injection (DIXON et collaborateurs, 1954). Une étude systématique des propriétés des antitoxines antidiphtériques dans diverses conditions d'immunisation a fait l'objet récemment de la thèse de RELYVELD (1958).

Les anticorps obtenus après une série d'injections antigéniques réagissent généralement mieux que les anticorps obtenus au début de l'immunisation avec des antigènes présentant avec l'antigène utilisé pour l'immunisation des réactions croisées. L'évolution tend à se faire vers un «élargissement» de la spécificité (voir LANDSTEINER 1945, page 144). Notons par exemple qu'après une injection unique, au lapin, d'albumine sérique humaine ou bovine, la proportion des anticorps réagissant à la fois avec ces deux antigènes est inférieure à 7 % (MAURER, 1954) alors qu'après plusieurs injections, ce pourcentage atteint environ 15 % (MELCHER et collaborateurs, 1953).

La première tentative systématique pour caractériser les anticorps, au cours de l'immunisation, par leur «avidité» a été présentée par JERNE dans sa thèse soutenue en 1951 à Copenhague. Le terme «avidité» avait été utilisé depuis longtemps par les immunologistes pour caractériser la vitesse de la combinaison entre antigène et anticorps, l'aptitude à se dissocier des complexes formés et la pente des courbes de neutralisation dans le cas des toxines. JERNE a fait l'hypothèse que ces différentes propriétés varient en fonction de la constante d'association de la combinaison initiale réversible, molécule à molécule, de l'antigène et de l'anticorps (toxine-antitoxine diphtérique). Nous ne discuterons pas de la validité de cette hypothèse. Si l'on ne peut considérer les déterminations expérimentales effectuées par JERNE comme des mesures de constantes d'équilibre, les résultats qu'il a obtenus donnent une indication intéressante sur l'évolution des anticorps en cours d'immunisation. Pour la plupart des espèces animales étudiées, une première injection d'anatoxine entraîne la synthèse d'anticorps de faible avidité. Cette avidité augmente avec le temps, même en l'absence de nouveau stimulus antigénique. L'injection secondaire entraîne une élévation importante et instantanée de l'avidité. Le lapin est remarquable par la rapidité avec laquelle, à la suite d'une injection unique, ses anticorps présentent une avidité élevée.

L'accroissement de l'avidité au cours de la réaction de rappel a été observé également par CHASE et WAGER (1957), toujours dans le cas de l'antitoxine diphtérique, l'animal d'expérience étant le cobaye. Des cellules de rate et de ganglions prélevées trois jours après l'injection de rappel et injectées à un cobaye non immunisé ont entraîné l'apparition chez cet animal d'anticorps dont l'avidité était identique à celle des anticorps simultanément formés chez le donneur.

Un autre exemple de l'accroissement de l'avidité des anticorps est apporté par FARR (1957). La technique proposée par cet auteur consiste à séparer l'antigène libre de l'antigène lié aux anticorps en précipitant les complexes antigène-anticorps par du sulfate d'ammonium à 50 % de saturation (l'antigène est une albumine hétérospécifique radioactive). Cette technique très sensible permet de mettre en évidence des différences qualitatives très marquées entre les immunosérums obtenus à la suite d'une injection primaire et d'une injection secondaire.

Si la nature de l'évolution des propriétés des anticorps, en cours d'immunisation, ne peut être considérée comme définie avec précision, il ne semble pas que la réalité même des modifications de l'ensemble de la population puisse être réellement mise en doute.

V - REACTIONS DE RAPPEL "NON SPECIFIQUES"

De nombreux auteurs ont observé que l'injection à un animal, antérieurement immunisé avec divers antigènes, d'un antigène ne présentant avec ceux-ci aucune réaction croisée, entraîne une élévation du titre des anticorps correspondant aux antigènes primitivement injectés. La réalité de ce phénomène a été contestée à la suite de nombreuses expériences du même type qui ont amené à des résultats entièrement négatifs. Cependant les observations de tels effets non spécifiques sont nombreuses, souvent établies avec beaucoup de soin, et on ne peut les ignorer. Les auteurs du début du siècle qui ont décrit cet effet lui ont donné le nom de réaction anamnétique. Ce terme a été souvent utilisé par la suite pour désigner la réaction de rappel. Cette confusion dans la terminologie n'a pas contribué à éclaircir ce problème.

Une excellente revue de ce sujet a été faite par FREUND (1953). Une des observations les plus classiques d'une réaction anamnétique est celle de WEIL et FELIX (1916) : au cours de nombreuses maladies comme le typhus, la pneumonie, la paludisme, la tuberculose, le titre

des agglutinines anti-typhiques s'élève chez les personnes antérieurement vaccinées contre la typhoïde, bien que des recherches de ce bacille dans le sang, les urines, les fèces demeurent entièrement négatives. Nous nous limiterons à rappeler en outre l'étude cinétique de ce phénomène effectuée par *BIELING* (1919). Une injection de *Shigella paradysenteriae* à des lapins immunisés, de trois semaines à quatre mois au préalable, par une injection de *Shigella dysenteriae* entraîne les effets suivants : les anticorps spécifiques des bactéries injectées secondairement apparaissent selon la cinétique normale d'une réponse primaire, mais cette deuxième injection entraîne, sans phase de latence, une élévation du titre (déterminé par agglutination) des anticorps correspondant au premier antigène. Un premier maximum est atteint le troisième jour puis le titre décroît pour revenir au niveau antérieur et enfin remonte pour atteindre au septième jour un deuxième maximum, plus élevé que le maximum atteint au troisième jour, mais inférieur à celui qui résulterait d'une injection homologe. Ces auteurs ont recherché, mais n'ont pas trouvé, de réactions croisées entre ces deux souches bactériennes.

Mais la recherche d'un tel phénomène a été très souvent complètement négative, en particulier lorsque des méthodes quantitatives ont été utilisées (*HEIDELBERGER* et *KENDALL*, 1935, *DIXON* et *MAURER*, 1955). *BIELING* lui-même reconnaissait que dans certaines conditions, l'injection du deuxième antigène n'exerçait aucune stimulation des anticorps de la première immunisation, voire même entraînait une diminution rapide de leur titre.

L'existence même de la réaction anamnétique est trop hypothétique pour servir d'argument à des interprétations théoriques; cependant, au cours d'expériences qui impliquent des injections successives d'antigènes différents, on ne saurait affirmer, en l'absence de contrôles appropriés, qu'un tel effet ne puisse se manifester.

Dans cette revue rapide des principaux aspects du phénomène de rappel, nous n'avons mentionné qu'une faible fraction de la littérature consacrée à ce problème. Cet aperçu nous aura cependant révélé l'importance et la grande généralité de ce phénomène, mais aussi la difficulté de le définir de façon univoque par des critères expérimentaux quantitatifs ou qualitatifs. Centrées sur l'étude de ce phénomène, nos recherches ont eu pour but d'en préciser la nature par l'emploi d'une méthodologie appropriée permettant d'évaluer de façon à la fois quantitative et qualitative l'évolution d'une population d'anticorps à la suite d'une injection de rappel.

CHAPITRE II

EFFETS D'INJECTIONS ESPACÉES DE DEUX ANTIGÈNES DIFFÉRENTS MAIS PRÉSENTANT ENTRE EUX DES RÉACTIONS CROISÉES

Nous rapporterons, dans ce chapitre, une première série d'expériences sur l'évolution de la spécificité des anticorps formés au cours d'une réaction de rappel «*hétérologue*». Nous désignons sous ce nom une expérience d'immunisation dans laquelle l'antigène de rappel et l'antigène utilisé pour l'immunisation primaire sont différents, encore que possédant en commun certains éléments de structure antigénique. Nous désignerons sous le nom de «*rappel homologue*» les expériences témoins dans lesquelles l'antigène primitif et l'antigène de rappel sont identiques. Dans ces premières séries d'essais, nous avons utilisé, pour la mise en évidence des anticorps, la technique d'héماغglutination passive et, pour la définition de leur spécificité, des techniques classiques d'épuisement. Nous avons en outre complété cette analyse par des fractionnements en présence d'adsorbants spécifiques solides.

Nous décrirons, dans la première partie de ce chapitre, les résultats des expériences proprement dites sur le rappel hétérologue; dans la seconde, les conditions et les résultats de l'analyse par fractionnement et par épuisement.

I - ETUDES DU RAPPEL HETEROLOGUE

Les antigènes utilisés sont d'une part une préparation purifiée d'albumine humaine et d'autre part la même albumine couplée par diazotation à l'acide sulfanilique. Nous désignerons ces deux antigènes

respectivement par AH et AHD. Les techniques d'héماغglutination passive mises en œuvre nous permettent de distinguer deux types d'anticorps dans les sérums d'animaux immunisés avec AHD, selon qu'ils réagissent ou non avec AH. Les anticorps qui se combinent encore avec AHD après épuisement d'un sérum anti AHD par AH seront appelés anticorps «spécifiques pour AHD».

Trois lots d'animaux ont été traités de la manière suivante :

	Injections primaires	Injection secondaire
Lot I	AH	AHD
Lot II	AHD	AHD
Lot III	AHD	AH

Le problème expérimental est de déterminer si les anticorps «spécifiques pour AHD» apparaissent selon la cinétique caractéristique d'une réaction de rappel dans les lots I et III, le lot II servant de référence.

1°) MATERIEL ET TECHNIQUES

Antigènes.

Albumine humaine (AH) - Préparation purifiée (*BEHRINGWERKE*) qui ne présentait à l'immunoélectrophorèse (*GRABAR* et *WILLIAMS* 1953) qu'une seule impureté en quantité minime, au niveau des α -globulines.

Albumine humaine diazotée (AHD) - La réaction de diazotation a été largement utilisée par les immunologistes, depuis les travaux de *LANDSTEINER*, pour coupler différents haptènes aux protéines. Cette réaction s'effectue par addition, à froid, à une solution neutre ou alcaline de protéine, du sel de diazonium d'une amine aromatique. La fixation de l'haptène s'effectue essentiellement au niveau des radicaux tyrosyl et histidyl (*PAULY*, 1915). Mais si le sel de diazonium est ajouté en excès, on peut fixer à la protéine une quantité d'haptène supérieure à celle dont peut rendre compte la combinaison avec ces deux aminoacides (*BOYD* et *HOOKER*, 1934).

La technique utilisée est la suivante : le sel de diazonium de l'acide sulfanilique (acide para aminobenzène sulfonique) est formé par addition à une solution à 1 % de cet acide en milieu chlorhydrique d'une solution

de nitrite de sodium dans une proportion équimoléculaire. La transformation en sel de diazonium est quantitative (*GRIGNARD*). La présence, puis la disparition progressive au cours de la réaction, de l'acide nitreux formé est recherchée par la réaction colorée qu'il donne avec une solution d'amidon et d'iodure de potassium. A la fin de la réaction, on ajoute quelques gouttes d'une solution à 10 % d'acide sulfamique pour détruire toute trace d'acide nitreux qui pourrait à l'étape suivante réagir avec les protéines. Puis on ajoute goutte à goutte le sel de diazonium ainsi formé à une solution à 2 % d'albumine humaine, sous agitation continue, le pH étant maintenu entre 7 et 8 par addition simultanée de soude N/5. La couleur jaune orangée des protéines diazotées, variable avec le pH, permet aisément d'éviter des écarts importants de pH. A la fin de cette opération, le pH est ajusté à 8,5. On attend trois heures pour que la réaction soit complète. Toutes ces réactions sont effectuées dans des bains de glace avec des réactifs préalablement refroidis.

La protéine diazotée est ensuite dialysée contre une solution de chlorure de sodium à 8,5 ‰ fréquemment renouvelée pendant quatre jours. Les solutions dont le titre d'azote est déterminé par micro-Kjeldahl sont conservées à -12° C.

Nous avons fait réagir avec l'albumine une quantité de sel de diazonium telle que, si le rendement avait été de 100 %, quarante groupes benzène sulfoniques auraient été fixés en moyenne à chaque molécule d'albumine (le poids moléculaire étant pris égal à 67 000). Le nombre de groupements effectivement fixés peut être déterminé, soit par un dosage de soufre dans le produit final, soit par photométrie (*EISEN, CARSTEN* et *BELMAN*, 1954), soit par mesure de la radioactivité en utilisant un haptène radioactif (*CRAMPTON* et *HAUROWITZ*, 1952). Monsieur *PICHAT*, du Commissariat à l'Energie Atomique, ayant effectué pour nous la synthèse d'acide sulfanilique marqué dans son groupement sulfonique par du soufre 35, nous avons pu déterminer avec précision le rendement de la diazotation effectuée dans ces conditions par de simples mesures de radioactivité. Ce rendement, déterminé au cours de plusieurs réactions de diazotation, reste très voisin de 32 %. C'est donc treize molécules d'haptène qui sont en moyenne fixées par molécule d'AHD. Des valeurs peu différentes du rendement de la réaction de diazotation de protéines ont été déterminées par d'autres auteurs (*KARUSH*, 1956, *CRAMPTON* et *HAUROWITZ*, 1952).

Autres antigènes - Pour effectuer des contrôles de la spécificité du **rappel**, trois autres antigènes ont été utilisés : une préparation purifiée de ribonucléase d'origine bovine (*WORTHINGTON*), une suspension de Salmonelles (type T 35-52) et une fraction de protéines

extraites d'E. coli précipitant, entre 28 et 32 % de sulfate d'ammonium. C'est à partir de cette fraction qui contient la majeure partie de la β -galactosidase que cet enzyme peut être purifié (COHN et MONOD, 1951).

Immunisation.

Modalité de l'injection d'antigène - Les animaux d'expérience sont des lapins mâles adultes, pesant 2,5 kg à 3 kg. Chacun des trois lots comprenait quatre lapins. L'immunisation primaire est constituée de trois injections intra veineuses, à 24 heures d'intervalle, de 5 mg d'antigène en solution isotonique. L'intervalle entre la première et la dernière de ces injections est trop court pour qu'aucun effet de rappel puisse se manifester. Ces injections répétées auraient sans doute pu être remplacées par une injection unique de 15 mg. Mais ce rythme d'injections nous a paru susceptible d'atténuer les différences qui pouvaient résulter des variations considérables dans la durée de persistance de AH et AHD dans le sang à la suite de leur injection. Alors que l'albumine humaine demeure dans le sang en quantité très lentement décroissante jusqu'à l'apparition des anticorps, l'AHD est éliminée du sang en moins de 24 heures, avant toute réaction immunitaire (DIXON et coll., 1953, CINADER et DUBERT, 1956).

L'injection secondaire effectuée trente et un jours après la première injection, consiste en une injection intra veineuse de 25 mg d'antigène en solution isotonique. Des seringues distinctes ont été utilisées, tout au long de l'expérience pour les injections de AH et AHD afin d'éviter toute possibilité de contamination d'un produit injecté par l'autre.

Prises de sang - Des prises de sang de 5 ml environ ont été effectuées à chaque lapin avant toute injection, puis cinq, sept, neuf, onze, treize, quinze, vingt et un et vingt neuf jours après la première injection d'antigène et un, deux, trois, quatre, cinq, six, huit, dix, douze et seize jours après l'injection secondaire. Il a été ainsi possible de déterminer avec précision la variation du titre des anticorps circulants au cours du temps.

Méthodes analytiques.

Hémagglutination passive - Cette technique décrite en 1951 par BOYDEN a fait l'objet d'études et de modifications par BORDUAS et

GRABAR (1953) et par STAVITSKY (1954). Elle consiste à fixer l'antigène sur des érythrocytes de mouton préalablement traités par le tanin et à observer jusqu'à quelle dilution un sérum immunisé agglutine ces hématies sensibilisées. Ce procédé qui permet, avec un antigène soluble, d'observer *in vitro* une agglutination et non plus une précipitation spécifique est d'une extrême sensibilité. Des quantités d'anticorps environ mille fois plus faibles peuvent ainsi être détectées. Alors qu'un précipité spécifique peut être encore dosé par la technique particulièrement sensible de FOLIN CIOCALTEU si la quantité d'anticorps correspond à 4 μg d'azote environ, l'hémagglutination passive permet de détecter des quantités d'anticorps correspondant à 5 milli μg (BORDUAS et GRABAR, 1953, GRABAR, 1957).

Les réactifs nécessaires sont deux tampons phosphate-chlorure de sodium de pH 7,2 ($\text{PO}_4 \text{ Na}_2\text{H}$ 0,0525 M, $\text{PO}_4 \text{ KH}_2$ 0,0225 M et Cl Na 0,075 M) et de pH 6,4 ($\text{PO}_4 \text{ Na}_2\text{H}$ 0,0225 M, $\text{PO}_4 \text{ KH}_2$ 0,0525 M, Cl Na 0,075 M), une solution de chlorure de sodium 0,15 M, une solution d'acide tannique au 1/20 000, des globules rouges de mouton et du sérum de lapin normal, chauffé une demi-heure à 56° C, dont on a épuisé les hémagglutinines anti-mouton. Toutes les solutions doivent être faites avec de l'eau distillée.

Les hématies de mouton sont lavées trois fois avec la solution Na Cl 0,15 M mises en suspension dans du tampon de pH 7,2 dans la proportion de 2,5 volumes de culot de centrifugation à 100 volumes de tampon. Cette suspension est mélangée à parties égales avec une solution d'acide tannique au 1/20 000 en Na Cl 0,15 M. Après dix minutes les hématies tannées sont centrifugées, lavées avec du tampon de pH 7,2 et remises en suspension (2,5 %) en Na Cl 0,15 M. A une partie de cette suspension, on ajoute alors quatre parties de tampon de pH 6,4 contenant 62,5 μg d'antigène par millilitre. Après quinze minutes de contact, les globules rouges tannés et sensibilisés sont centrifugés et lavés trois fois avec du sérum de lapin normal préalablement chauffé et épuisé, dilué au 1/100 en Na Cl 0,15 M. La suspension finale est effectuée dans ce même milieu à concentration deux fois plus élevée que précédemment (5 %). Le contrôle de la concentration est effectué en ajoutant 2 ml d'eau distillée à 0,3 ml de cette suspension. Après un barbotage de cinq minutes par du gaz d'éclairage, la densité optique de la solution ainsi obtenue doit être de 0,6 dans des cellules de 1 cm d'épaisseur à 572 $\text{m}\mu$.

Les sérums à tester sont décomplémentés par chauffage dans des tubes hermétiquement bouchés, pendant une demi-heure à 56° C, et les anticorps naturels anti-érythrocytes de mouton sont adsorbés par ad-

dition de 0,1 ml de culot d'érythrocytes lavés par millilitre de sérum. Ils sont éliminés par centrifugation. Les dilutions sont faites en sérum de lapin normal chauffé et épuisé, dilué au 1/100, de façon à obtenir des gammes contenant 0,5 ml par tube d'immunsérums dilués au 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/1000, 1/5000, 1/10 000, 1/20 000, 1/50 000, 1/100 000. Les dilutions de 10 en 10 sont effectuées avec précision, et à partir de celles-ci, sont faites les dilutions intermédiaires.

A chacun de ces tubes contenant 0,5 ml d'une dilution donnée est ajouté 0,1 ml de la suspension de globules rouges tannés et sensibilisés. Les portoirs sont rapidement agités et la lecture est faite lorsque les hématies ont sédimenté, soit après au moins trois à quatre heures. Le titre est l'inverse de la dilution de l'antisérum qui provoque encore une agglutination certaine. Les différents aspects observés sont reproduits dans une planche présentée par STAVITSKY (1954).

Si un antisérum est dilué avec un sérum normal et si les titres de ces divers sérums reconstitués sont déterminés par cette méthode, on obtient une proportionnalité très stricte entre les titres observés et les dilutions préalablement effectuées.

Les titres observés pour un antisérum donné peuvent différer d'un facteur un demi, parfois un quart, d'un test à un autre. Les valeurs qui doivent être directement comparées ont été, au cours de ce travail, déterminées dans un même test. L'analyse de trente à quarante sérums, nécessitant de trois à cinq cents tubes, peut être effectuée par cette méthode dans la même journée.

Epuisement de sérums anti AHD par AH - Des quantités croissantes d'AH sont ajoutées sous un même volume à des volumes constants de sérum anti AHD préalablement chauffé et épuisé par des érythrocytes de mouton. Le mélange est laissé deux heures à 37° C, puis dix-huit heures à +4° C. Le précipité spécifique qui a pu se former dans certains tubes est éliminé par centrifugation. Deux gammes de dilution sont alors effectuées à partir de chacun des tubes précédents. Une gamme est testée avec des globules rouges tannés sensibilisés par AH, l'autre avec des globules rouges tannés et sensibilisés par AHD. Lorsque la quantité d'AH ajoutée croît, à partir d'une valeur suffisamment faible, on observe d'abord une décroissance progressive du titre déterminé vis-à-vis des deux antigènes, puis pour une valeur caractéristique de « l'équivalence » entre la quantité d'antigène et d'anticorps, le titre d'hémagglutination envers AH devient nul. A partir de cette quantité d'AH et pour des valeurs deux, cinq, dix, vingt fois supérieures, le

titre déterminé vis-à-vis d'AHD reste constant : ces anticorps qui réagissent avec AHD, mais non avec AH, seront désignés sous le nom d'anticorps « spécifiques pour AHD ».

Si l'on traite un sérum anti AH par des quantités croissantes d'AHD, on observe en utilisant le même test que précédemment la disparition totale de tous les anticorps.

Autres techniques utilisées au cours d'expériences de contrôle. - Les anticorps anti ribonucléase et antiprotéines d'E. coli ont été détectés par la réaction d'hémagglutination passive, les hématies de mouton tannées étant sensibilisées, dans les conditions habituelles, par la ribonucléase ou par la fraction de protéines d'E. coli utilisée comme antigène.

Les anticorps anti Salmonelles ont été titrés par la technique classique d'agglutination d'une suspension standardisée.

La sensibilité des méthodes utilisées pour les contrôles et pour l'expérience elle-même est ainsi identique.

2°) RESULTATS

Les graphiques de la figure 2 représentent la variation du titre des anticorps anti AH et des anticorps « spécifiques pour AHD » pour un individu caractéristique de chacun des trois lots. Sur ces graphiques est rappelée la nature des antigènes successivement injectés.

Le lot II (injections primaires et secondaires de AHD) est un contrôle des techniques d'immunisation et de titrage. Il permet de définir les caractéristiques de la réponse primaire et secondaire pour les anticorps anti AH et les anticorps « spécifiques pour AHD ». Les anticorps anti AH apparaissent le septième jour après la première injection d'antigène et atteignent leur titre maximum du dixième au treizième jour. Les titres sont pratiquement constants jusqu'à l'injection de rappel effectuée au trente et unième jour. Parfois une diminution de moitié, c'est-à-dire une différence de un tube dans les gammes d'hémagglutination, est observée pendant cette période.

Les lapins du groupe II et du groupe III ont reçu la même immunisation primaire. Alors que trois lapins du groupe III ont présenté au cours de la réponse primaire des anticorps « spécifiques pour AHD », ces anticorps n'ont pas été détectés chez les animaux du groupe II. Lorsque ces anticorps sont détectables à cette phase, ils apparaissent au

septième jour comme les anticorps anti AH, mais les titres atteints restent dans deux cas à la limite de ce qui est détectable (10 et 20) et une diminution de moitié se traduit par une disparition apparente de ces anticorps.

L'injection de rappel (AHD, lot II) entraîne une disparition presque immédiate des anticorps circulants; ils réapparaissent généralement au deuxième jour, parfois seulement au troisième ou au quatrième jour.

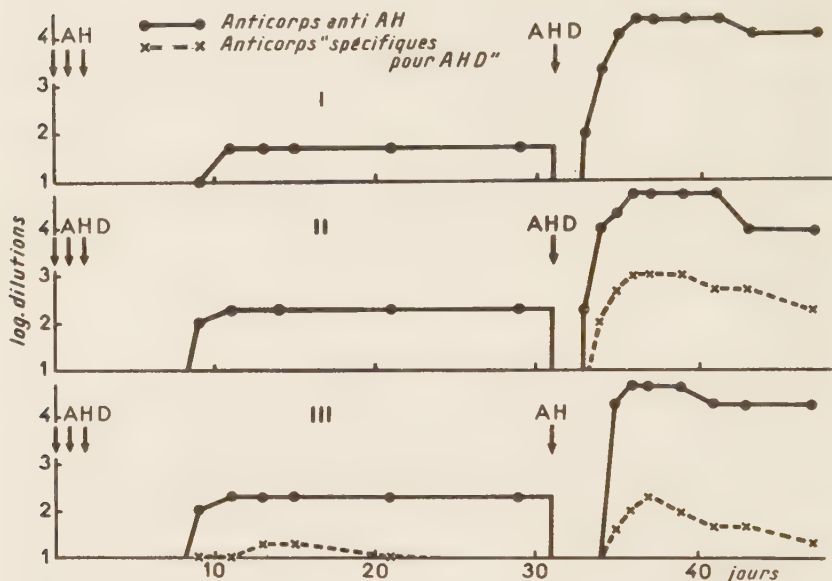


Figure 2. - Variation du titre des anticorps pour un individu caractéristique de chacun des trois lots.

Le maximum est atteint trois jours après, se maintient quelques jours à cette valeur puis décroît lentement. Les titres atteints au cours de la réponse secondaire sont de dix à cent fois supérieurs à ceux obtenus au cours de la réponse primaire. Dans tous les cas étudiés, les anticorps «spécifiques pour AHD» sont mesurables après l'injection secondaire.

Dans le lot I (AH puis AHD) la réponse secondaire pour les anticorps anti AH a été typique, mais aucun anticorps «spécifique pour AHD» n'a pu être détecté après l'injection de AHD. Ce fait prouve qu'il n'y a pas eu de réponse secondaire pour ces anticorps, puisqu'ils sont

toujours à des titres modérément élevés après une injection secondaire. Cette absence observée au delà du douzième jour chez tous les lapins de ce groupe tend même à indiquer que la réponse a été inférieure à une réponse primaire pour ce type d'anticorps.

Dans le lot III (AHD puis AH) on observe une réponse secondaire typique pour les anticorps anti AH et pour les anticorps «spécifiques pour AHD». Dans le graphique de la figure 2 représentant la réponse d'un des individus du groupe III, on voit que les anticorps anti AH et «spécifiques pour AHD» ne deviennent détectables que quatre jours après l'injection de rappel. Une phase de latence également longue

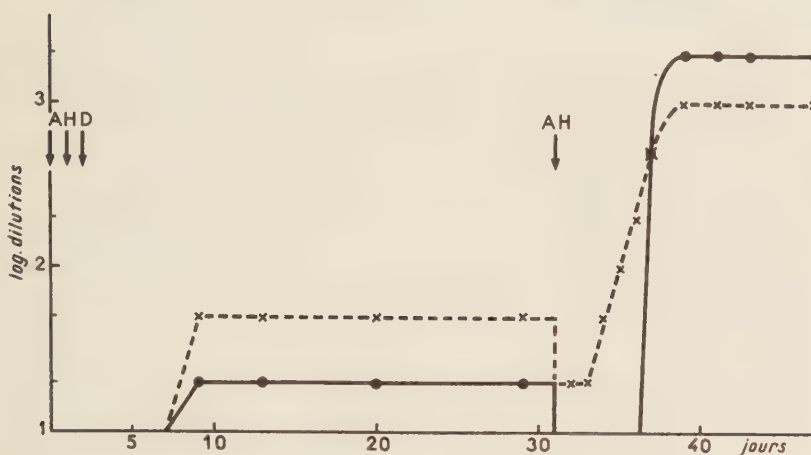


Figure 3. - Variation du titre des anticorps anti AH (traits pleins) et des anticorps «spécifiques pour AHD» (en tirets) pour le lapin N 432 du lot III.

a été observée pour un des lapins du groupe II. La variation au cours du temps des titres relatifs aux deux types d'anticorps est identique.

Un des lapins du lot III n'a présenté aucun anticorps détectable. anti AH ou «spécifique pour AHD», à la suite de ces injections antigéniques. Le fait que des individus ne forment pas d'anticorps en réponse à l'injection de certains antigènes a fait l'objet d'une étude génétique (SANG et SOBEY 1954). Il s'agit d'un phénomène qui n'est pas exceptionnel. Nous avons eu l'occasion d'observer des cas semblables au cours d'expériences effectuées en collaboration avec CINADER (CINADER et DUBERT 1955) et avec PARAF (1957).

Un lapin de ce groupe III a présenté, dès la réponse primaire, un comportement atypique (figure 3). Alors que chez tous les autres lapins le titre des anticorps anti AH est très supérieur au titre des anticorps «spécifiques pour AHD», c'est l'inverse qui se produit dans ce cas : le titre des anticorps «spécifiques pour AHD» est, au cours de la phase primaire, supérieur de deux fois au titre des anticorps anti AH. Grâce sans doute à ce titre relativement élevé, ces anticorps sont encore mesurables au moment de l'injection secondaire de AH. Leur taux s'abaisse alors légèrement pendant deux à trois jours. La différence des hémagglutinations ne porte que sur un tube, ce qui est à peine significatif. Cette baisse transitoire est toutefois rendue plus probable du fait qu'un titre de 20 a été trouvé deux fois de suite, un et deux jours après l'injection, alors qu'un titre de 50 a été observé quatre fois de suite au cours de la phase primaire. A partir du cinquième jour, le titre devient plus élevé, de façon significative (titre de 200). Le titre maximum (1000) est atteint du septième au huitième jour et persiste à cette valeur au moins jusqu'au seizième jour. Les anticorps anti AH, disparus après l'injection secondaire, réapparaissent au sixième jour pour atteindre du septième au huitième jour une valeur maximum et s'y maintenir quelques jours. Bien que la phase de latence ait été anormalement longue, les titres atteints sont caractéristiques d'une réponse secondaire.

L'inversion de la position relative des deux courbes (figure 3) entre la réponse primaire et la réponse secondaire ne saurait être considérée comme une indication que la stimulation par AH de la synthèse des anticorps «spécifiques pour AHD» a été inférieure à celle qui aurait été provoquée par AHD. De nombreux faits expérimentaux indiquent que la proportion des divers anticorps suscités par un antigène varie à la suite de la répétition des injections de ce même antigène.

Le problème de l'efficacité du rappel par AH des anticorps «spécifiques pour AHD» n'en est pas moins posé. Si l'on compare (tableau I) les titres maximums obtenus pour ce type d'anticorps au cours du rappel dans les groupes II et III, on note une remarquable similitude : les titres sont de 1000, 500 et 50 pour le lot II, de 1000, 200 et 50 pour le lot III. Toutefois le titre de 1000 a été observé dans le lot III pour un individu particulièrement apte à produire des anticorps «spécifiques pour AHD» (figure 3). Seuls les trois animaux du groupe III avaient déjà ces anticorps détectables dans leur sérum au cours de la phase primaire; l'identité des titres atteints par la suite pourrait traduire de ce fait une synthèse de ces anticorps plus importante après une injection secondaire de AHD qu'après une injection secondaire de AH. La

TABLEAU I

Titres maximums observés avant et après
un rappel homologue ou hétérologue

Lots	Numéros des lapins	Titres maximums réponse primaire		Titres maximums réponse secondaire	
		anti AH	spécifiques pour AHD	anti AH	spécifiques pour AHD
I	N 414	200	0	5 000	0
	N 415	50	0	20 000	0
	N 416	100	0	10 000	0
	H 175	50	0	20 000	0
II	N 422	20	0	5 000	500
	N 423	20	0	2 000	50
	H 183	200	0	20 000	1 000
III	N 431	100	10	2 000	50
	N 432	20	50	2 000	1 000
	N 433	0	0	0	0
	H 182	200	20	20 000	200

- Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution maximum donnant encore une hémagglutination positive - « Zéro » signifie qu'aucune hémagglutination n'a été observée, donc que le titre est inférieur à 10.
- Les résultats de la figure 2 correspondent aux lapins H 173, H 185, H 182. Les résultats de la figure 3 au N 432.
- Un des lapins du groupe II est mort au début de l'expérience.

variabilité quantitative aussi bien que qualitative de la réponse immunitaire d'un individu à un autre est trop grande pour que l'on puisse tirer des conclusions définitives de cette comparaison établie entre trois individus de chaque sorte.

Néanmoins il est certain que l'injection de AH à des lapins préalablement immunisés avec AHD entraîne une élévation du titre des anticorps « spécifiques pour AHD » qui est caractéristique d'une réponse secondaire par les titres maximums atteints et par la cinétique de cet accroissement.

Les résultats du lot I montraient clairement que l'injection de AHD à des lapins préalablement immunisés avec AH n'entraîne pas de réaction de rappel pour les anticorps « spécifiques pour AHD ».

L'ensemble de nos résultats semble donc être conforme à la règle suivante : au cours de la réponse secondaire, les anticorps formés correspondent à l'antigène primitivement injecté (anti AH pour le lot I, anti AHD pour les lots II et III).

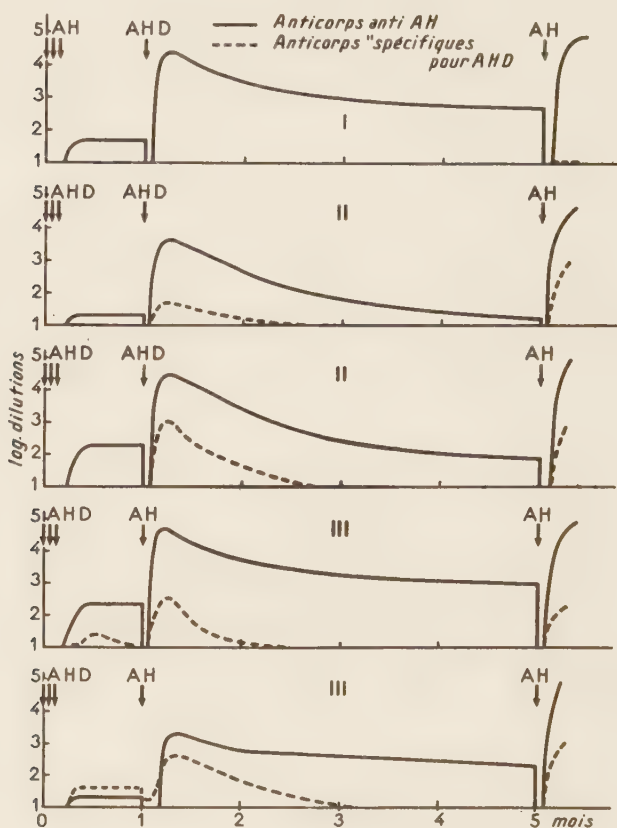


Figure 4. - Variation du titre des anticorps pour un individu du lot I et deux individus de chacun des lots II et III. Deux injections de rappel ont été effectuées à quatre mois d'intervalle.

Une nouvelle injection de rappel a été faite à deux lapins de chacun des trois lots, quatre mois après l'injection secondaire, c'est-à-dire cinq mois après la première injection d'antigène. Cette injection, faite

TABLEAU II

Evolution des titres à la suite de deux rappels hétérologues

Lots	N° des lapins	Titres maximums après le 1er rappel		Titres avant le 2ème rappel		Titres maximums après le 2ème rappel	
		anti AH	spécif. pour AHD	anti AH	spécif. pour AHD	anti AH	spécif. pour AHD
I	N 414	5 000	0	200	0	50 000	10
	H 173	20 000	0	1 000	0	50 000	10
II	N 423	2 000	50	20	0	20 000	1 000
	H 183	20 000	1 000	200	0	100 000	1 000
III	N 432	2 000	1 000	1 000	0	10 000	500
	H 182	20 000	200	1 000	0	100 000	200

Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution maximum donnant encore une hémagglutination positive - « Zéro » signifie qu'aucune hémagglutination n'a été observée, donc que le titre est inférieur à 10.

par voie intra-veineuse, a été uniformément de 25 mg de AH en solution. Des prises de sang ont été effectuées tous les mois entre les deux injections de rappel et tous les jours pendant les huit jours qui ont suivi la dernière injection.

Les observations faites à la suite de cette deuxième injection de rappel (figure 4) (tableau II) confirment nos premiers résultats.

On remarque tout d'abord sur ces courbes qu'après le maximum atteint à la suite du premier rappel, les titres mesurés par la méthode d'hémagglutination décroissent assez rapidement pendant quelques semaines, puis très lentement par la suite. Il est d'ailleurs classique d'observer une telle cinétique. La variation du titre des anticorps « spécifiques pour AHD » semble parallèle à celle des anti AH, mais les titres initiaux étant plus faibles, ces anticorps deviennent indétectables en un à deux mois. La deuxième injection de rappel entraîne la disparition instantanée du sérum des anticorps anti AH. Ceux-ci réapparaissent dans tous les cas au deuxième ou troisième jour, et atteignent du cinquième au septième jour, un titre supérieur d'au moins deux à quatre fois au titre atteint au cours du premier rappel.

Dans le lot I, la dernière injection de AH n'a provoqué la formation qu'en quantité à peine détectable (titre de 10) des anticorps «spécifiques pour AHD», dans les délais normaux d'une injection de rappel. Si une réponse primaire normale avait été produite vis-à-vis des motifs caractéristiques de AHD à la suite de la première injection de rappel effectuée avec AHD, on aurait dû observer à la suite de la dernière injection de AH un effet de rappel analogue à celui précédemment observé dans le lot III (AHD-AH). Les constatations successives effectuées sur les animaux du groupe I tendent ainsi à indiquer que l'injection de AHD, à un animal préalablement immunisé envers AH, immunise mal envers les motifs structuraux caractéristiques de cet antigène. Mais cette dernière proposition, qui s'appuie sur la comparaison de résultats obtenus dans ces conditions expérimentales dissimilaires, ne saurait être considérée comme démontrée.

Selon la même cinétique, réapparaissent chez les lapins des groupes II et III, les anticorps «spécifiques pour AHD». Les conditions du rappel dans le groupe II sont maintenant celles du groupe III après l'injection secondaire et on obtient ainsi une confirmation de nos résultats antérieurs : une injection de AH à un animal préalablement immunisé avec AHD entraîne une réaction de rappel pour les anticorps «spécifiques pour AHD». Les conditions réalisées dans le lot III sont un peu différentes : l'injection primaire d'AHD est suivie de deux injections espacées de AH. Deux fois de suite et à un intervalle de quatre mois, l'injection de AH a déclenché un rappel des anticorps «spécifiques pour AHD». La formation d'anticorps anti AH semble devenue inséparable chez ces animaux de celle des anticorps «spécifiques pour AHD».

Contrôle de la spécificité de la réaction de rappel - Il est essentiel, pour l'interprétation des résultats que nous venons de présenter, de montrer que l'augmentation du titre des anticorps «spécifiques pour AHD» à la suite d'une injection secondaire de AH (lot III, puis lot II) n'est pas due à un phénomène non spécifique.

Nous avons effectué sur trois groupes de lapins une immunisation primaire qui consistait en trois injections intraveineuses, espacées de vingt quatre heures, de 5 mg de AHD et, selon le groupe, de 5 mg de ribonucléase d'origine bovine, de $2 \cdot 10^9$ Salmonelles tuées (T35-52) ou de 1 mg de protéine extraite d'E. coli. Trente et un jours après la première injection, 25 mg de AH sont injectés par voie intraveineuse à tous les animaux. Des prises de sang sont effectuées quatorze, vingt et un et vingt huit jours après la première injection, cinq, six et dix jours après l'injection de rappel. Si l'élévation du titre des anticorps

«spécifiques pour AHD» au cours du rappel n'était pas spécifique, on devrait observer simultanément un accroissement des anticorps anti ribonucléase, anti Salmonelles, ou anti protéine d'E. coli.

Dans le groupe injecté avec le mélange AHD-ribonucléase, on a observé la réapparition d'anticorps anti-ribonucléase à la suite de l'injection de AH. Après avoir atteint un titre de 10 à 100 au cours de la réponse primaire, ces anticorps deviennent indétectables, puis réapparaissent à des titres très faibles (10 à 20) après le rappel. Il existait en fait une réaction croisée entre AH et la ribonucléase. Deux hyperimmunsérums anti AH dont nous disposions agglutinaient au 1/50 des hématies de mouton tannées et sensibilisées avec cette préparation de ribonucléase. Un mélange de sérums hyperimmunisés contre la ribonucléase que m'avait envoyé pour d'autres essais le Dr. B. CINADER, donnait un test d'hémagglutination positif avec AH. Cette constatation a été confirmée par le Dr. B. CINADER, uniquement d'ailleurs pour ce mélange-ci d'antisérum. Il est possible que cette réaction croisée soit due à la contamination de la ribonucléase utilisée par des traces d'albumine bovine. Mais, du fait de cette réaction croisée, cette expérience n'apporte pas de réponse à la question posée.

Avec les Salmonelles, nous n'avons observé aucune réaction croisée. Les titres d'agglutination des suspensions de bactéries décroissaient lentement avec le temps, et cette décroissance n'a pas été

TABLEAU III

N° des lapins	Nombre de jours après l'injection primaire				Nombre de jours après l'injection secondaire					
	14		30		5		7		11	
S 170	100	<i>512</i>	200	<i>256</i>	2 000	<i>256</i>	10 000	<i>128</i>	20 000	<i>128</i>
S 171	200	<i>256</i>	100	<i>128</i>	50 000	<i>128</i>	50 000	<i>128</i>	50 000	<i>128</i>
S 172	100	<i>64</i>	100	<i>32</i>	2 000	<i>32</i>	10 000	<i>16</i>	10 000	<i>16</i>
S 175	100	<i>256</i>	200	<i>64</i>	20 000	<i>32</i>	50 000	<i>32</i>	20 000	<i>32</i>

- Les chiffres en italique représentent les titres observés pour les agglutinations de suspension de Salmonelles. Les dilutions ont dans ce cas été effectuées selon une raison un demi .

- Les chiffres en caractères courants représentent les titres observés pour les anticorps anti AH.

modifiée par l'injection de AH (tableau III). Toutefois on peut objecter à ces résultats pourtant très nets, que cet antigène était de nature particulière et que le test utilisé pour définir le titre était différent de l'hémagglutination passive. C'est pourquoi nous avons utilisé comme antigène des protéines extraites d'E. coli et solubles dans une solution de chlorure de sodium à 8,5 %. Les anticorps correspondants ont été détectés par hémagglutination passive, les hématies tannées étant sensibilisées avec ces protéines solubles.

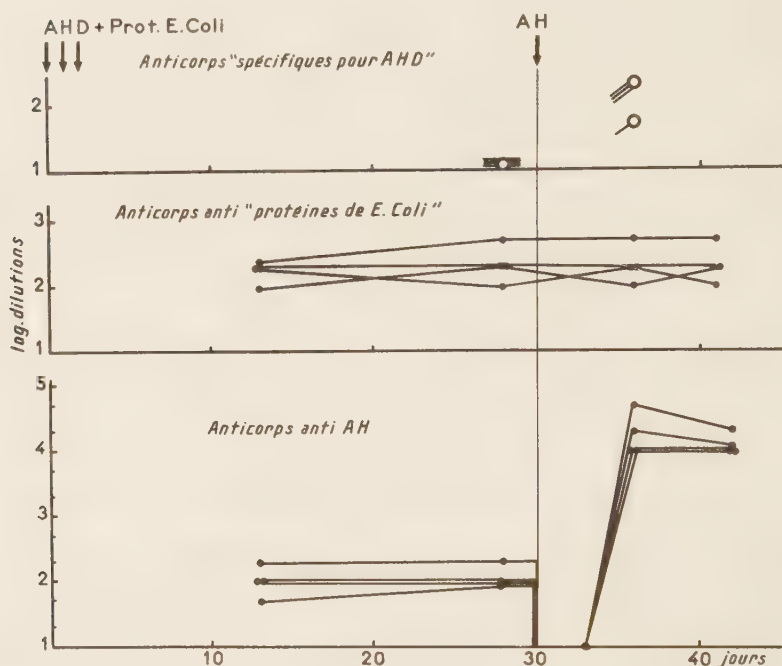


Figure 5. - Les trois graphiques superposés dans cette figure représentent chacun, pour quatre lapins immunisés de la même manière, les variations de titre de chacun des trois types d'anticorps que nous pouvons distinguer dans ces immunosérums.

Les résultats présentés dans la figure 5 montrent clairement que l'injection de AH entraîne une réaction de rappel pour les anticorps anti AH et les anticorps «spécifiques de AHD». Mais le titre des anticorps anti protéines d'E. coli reste constant tout au long de la période

d'observation, les variations n'excédant jamais un facteur 2, c'est-à-dire un écart de un tube dans les gammes de dilution, ces différences de titre, non significatives, étant d'ailleurs distribuées apparemment au hasard.

Si à des lapins ayant subi la même immunisation primaire (AHD et protéines d'E. coli), on fait une injection secondaire avec ces protéines d'E. coli, on n'observe aucune variation des anticorps anti AH, ni des anticorps «spécifiques pour AHD», alors que s'élève le titre des anticorps anti protéines d'E. coli.

Nous n'avons donc pas observé de réaction anamnétique au sens défini par *BIELING* en particulier, dans les conditions de nos expériences. L'élévation du titre des anticorps «spécifiques pour AHD» observée chez un animal immunisé avec AHD à la suite d'une injection secondaire de AH doit par conséquent être considérée comme un phénomène spécifique. Pour donner à cette constatation expérimentale sa signification, il est nécessaire de rechercher la nature des sites antigéniques qui correspondent aux anticorps définis comme «spécifiques pour AHD». C'est le but de l'étude analytique que nous allons maintenant rapporter.

II - ETUDE ANALYTIQUE DES ANTICORPS ANTI AHD

L'interprétation à donner aux résultats relatés dans la première partie de ce chapitre est tout à fait différente selon que les anticorps définis comme «spécifiques pour AHD» correspondent à un motif essentiellement caractérisé par l'acide benzène sulfonique, ou bien à des structures protéiques altérées par suite de la fixation de l'haptène. Dans le premier cas, il s'agit d'un motif antigénique nouveau; dans l'autre cas, de motifs qui peuvent présenter certaines analogies avec la structure de la protéine non diazotée.

L'étude des anticorps anti azoprotéines a fait l'objet de nombreux travaux depuis que *LANDSTEINER* a montré l'intérêt de cette classe d'antigènes.

L'exemple suivant, emprunté au travail de *HAUROWITZ* (1936) apporte la preuve de l'existence d'au moins trois catégories d'anticorps dans un sérum anti azoprotéine. A un immunosérum de lapin anti globulines de cheval couplées par diazotation à l'acide arsanilique sont ajoutés successivement et dans l'ordre, des globulines de cheval, des globulines de lapin couplées par diazotation à l'acide arsanilique et

enfin l'antigène homologue, chaque nouvelle addition n'étant effectuée que lorsqu'aucun précipité ne peut plus être formé avec la protéine précédente. Les quantités de précipité successivement formées sont, dans l'exemple cité, dans la proportion de 1, 2, 2. Il existe donc dans un tel immunosérum des anticorps adaptés à la protéine antigénique non conjuguée, des anticorps adaptés au groupe hapténique et sans doute à la partie adjacente de la protéine et enfin une troisième catégorie d'anticorps qui ne réagit qu'avec l'antigène homologue. Ces résultats ne permettent pas de délimiter le rôle joué dans la spécificité de ces deux derniers types d'anticorps par l'haptène et par les structures protéiques altérées au cours de la réaction de diazotation.

Les résultats d'une analyse remarquable effectuée en 1954 par *EISEN*, *CARSTEN* et *BELMAN*, soulignent la difficulté d'une telle distinction. Le schéma de leurs expériences et des expériences de *HAUROWITZ*, est essentiellement le même, mais ces auteurs ont analysé les surnageants des différents précipités par dialyse à l'équilibre pour mettre en évidence directement les anticorps anti haptènes. Ceux-ci ne peuvent être totalement précipités ni par une protéine hétérologue conjuguée à l'haptène ni même par l'antigène homologue. De plus, la fraction des anticorps anti haptènes précipitée par la protéine hétérologue conjuguée à l'haptène est variable selon la nature de cette protéine hétérologue qui ne présentait dans aucun cas de réaction croisée avec la protéine de l'antigène. Le procédé qui consiste à utiliser pour la caractérisation des anticorps anti haptènes une protéine différente de la protéine utilisée pour l'immunisation, mais fixée au même haptène, aboutit en fait à la séparation arbitraire d'un groupe d'anticorps qui ne représente pas la totalité des anticorps anti haptènes et dont la spécificité n'est pas uniquement déterminée par l'haptène.

Les trois types d'analyses que nous allons décrire ont pour but de définir, dans la mesure du possible, la nature des sites antigéniques auxquels correspondent les anticorps que nous avons définis comme «spécifiques pour AHD».

1°) FRACTIONNEMENT DES ANTICORPS ANTI AHD PAR PASSAGE SUR UNE COLONNE DE CELLULOSE COUPLEE CHIMIQUEMENT A L'HAPTENE

Ce procédé de séparation des anticorps a été décrit par *LERMAN* (1953) et par *CAMPBELL*, *LUESCHER* et *LERMAN* (1951). Si on fait passer à travers une colonne de cellulose chimiquement couplée à

l'haptène, un antisérum ou les globulines séparées à partir de ce sérum, les anticorps anti haptènes sont retenus sur la colonne et toutes les protéines sans affinité pour l'haptène sont aisément éliminées par lavage avec une solution tampon ou de l'eau physiologique (0,15 M Na Cl). Les anticorps anti haptènes sont ensuite élués par une solution concentrée de l'haptène, puis éventuellement séparés de l'haptène par dialyse.

Tous les résultats analytiques de *LANDSTEINER*, *HAUROWITZ*, *EISEN*, que nous avons précédemment rapportés ont été obtenus à partir de sérums d'animaux ayant reçu des séries d'injections répétées au cours de plusieurs semaines consécutives. C'est, de même, sur des sérums d'animaux hyperimmunisés qu'il nous a été nécessaire d'effectuer cette analyse.

Matériel et techniques.

Immunisation - Nous rapporterons les résultats obtenus avec les immunsérums provenant de deux lapins ayant reçu deux séries d'injections de AHD à six semaines d'intervalle. Chaque série était constituée de cinq injections intraveineuses de 5 mg de AHD en solution, les injections étant effectuées tous les trois jours. Les sérums ont été prélevés sept jours après la dernière injection.

Préparation des globulines - On ajoute sous agitation continue à un volume donné de sérum un volume de sulfate d'ammonium 3 M tel que la concentration finale soit de 1,75 M (*CARSTEN* et *EISEN*, 1955). Le précipité formé est lavé deux fois avec une solution de sulfate d'ammonium 1,75 M. Il est alors redissous en tampon phosphate de pH 7,4 (Cl Na 0,15 M, phosphate 0,05 M) et dialysé contre ce tampon jusqu'à élimination complète du sulfate d'ammonium.

Couplage de l'haptène à la poudre de cellulose (d'après *LERMAN*) - Le traitement de la cellulose est le suivant : 100 g de cellulose (Aku-Flox) sont mis en suspension dans 300 ml de Na OH M/10 et un volume d'eau suffisant pour que la suspension puisse être aisément agitée. On porte à une température proche de l'ébullition, sous une forte agitation et 10 g d' α bromo - p - nitrotoluène dissous dans 100 ml d'acétone sont ajoutés lentement. Ce corps étant lacrymogène et allergène, il est nécessaire d'opérer sous une hotte. Le mélange est maintenu en ébullition douce pendant une heure sous agitation. L'acidification progressive du milieu traduit le couplage avec la cellulose. La cellulose est

filtrée, lavée à l'eau et remise en suspension dans une solution contenant 10 g de carbonate de sodium et 10 g de bicarbonate. Un excès, environ 15 g, d'hydrosulfite de sodium (dithionite) est ajouté sous agitation. Le pH est maintenu légèrement alcalin par addition de carbonate. Cette réaction est plus rapide à chaud. L'excès d'hydrosulfite est détecté par la décoloration du bleu de méthylène. On filtre et on lave énergiquement avec du carbonate dilué, de l'eau et enfin avec l'acide chlorhydrique dilué.

Les réactions suivantes sont effectuées entre 0° et 4° C; la cellulose couplée au radical para aminotoluène est mise en suspension en HCl M/10 et du nitrite de sodium est ajouté jusqu'à ce que le test avec l'amidon-IK soit positif. L'excès de NO_2^- ainsi détecté est ensuite détruit par addition d'acide sulfamique. On a obtenu le sel de diazonium.

La suspension est alors mélangée, sous une vigoureuse agitation, avec une solution contenant environ 2 g de résorcinol en tampon carbonate bicarbonate. Le pH à la fin de l'addition doit être de 8 à 9. Le produit est alors lavé abondamment avec du carbonate dilué, jusqu'à ce que le filtrat soit incolore, puis avec de l'eau. Il présente une coloration jaune franc.

La dernière étape consiste à ajouter un excès de sel de diazonium de l'acide sulfanilique (1 à 2 g) à la cellulose couplée au résorcinol en suspension dans un milieu alcalin. La suspension prend une couleur brunâtre. Elle est filtrée et lavée avec une solution alcaline jusqu'à ce que l'effluent soit incolore. Elle est alors lavée avec de l'eau distillée. La cellulose couplée à l'acide sulfanilique présente une coloration orange. Elle est conservée à l'état de poudre sèche.

Séparation des anticorps anti haptènes par passage sur une colonne de cellulose diazotée - Environ 1 g de cellulose couplée à l'acide sulfanilique est mis en suspension dans le même tampon phosphate de pH 7,4 qui nous sert à dissoudre les globulines. On réalise une colonne dans un tube en verre d'environ 30 cm de haut et de 9 mm de diamètre, rétréci à sa partie inférieure. Après avoir lavé la colonne par du tampon phosphate, on laisse s'écouler lentement à travers la colonne 3 ml de globulines (à la même concentration environ que dans le sérum) puis on ajoute à nouveau du tampon phosphate. L'effluent est recueilli dans une série de tubes. Les six premiers millilitres contiennent la presque totalité des protéines : cette première fraction sera appelée fraction 1. L'effluent continue à être collecté jusqu'à disparition complète de toute trace de protéine. Ce lavage est effectué par un volume de tampon égal

à environ six fois le volume liquide de la colonne. Puis on fait passer sur cette colonne une solution d'acide sulfanilique 10^{-1} M en tampon phosphate, le pH étant maintenu à 7,4. Dès lors, l'effluent est recueilli par fractions successives de 2 ml et on recherche la présence de protéines par la réaction de précipitation en microtubes à l'interface d'une solution d'acide trichloracétique à 5 % et d'un échantillon de ces diverses fractions. Les six premiers millilitres collectés à partir du front de la solution concentrée d'haptène contiennent plus de 90 % des protéines susceptibles d'être éluées dans ces conditions. Cette deuxième fraction sera appelée fraction A. La réaction du disque reste très faiblement positive pour les cinq ou six fractions suivantes.

Si les globulines, ou d'ailleurs le sérum entier, proviennent d'un animal non immunisé vis-à-vis de cet haptène, aucune trace de protéine n'est éluée par cette solution concentrée d'haptène.

Les protéines éluées (fraction A) sont ensuite débarrassées de l'acide sulfanilique, présent à la concentration de 10^{-1} M, par dialyse contre le tampon phosphate fréquemment renouvelé. La fraction 1 est également dialysée pour éliminer d'éventuels haptènes libérés par la cellulose.

Déterminations effectuées sur les fractions 1 et A et sur les globulines non fractionnées («globulines initiales») - Chaque groupe de globulines ayant été dilué de moitié au cours du fractionnement, il convenait de comparer les propriétés des fractions obtenues à celles d'une dilution au demi des globulines initiales. Les tests suivants ont été effectués :

- Mesure de la densité optique à $280\text{ m}\mu$ au Beckman, dans une cellule de 1 cm d'épaisseur (après dilution pour les globulines initiales et la fraction 1).
- Hémagglutination passive avec des globules rouges tannés et sensibilisés par AH ou par l'albumine de lapin diazotée (ALD), (cette diazotation étant effectuée dans les mêmes conditions que pour AHD).
- Mesure après épuisement par AH du titre des anticorps «spécifiques pour AHD».
- Détermination de l'affinité de ces diverses fractions pour l'haptène par dialyse à l'équilibre.

Dialyse à l'équilibre - Cette méthode, dans les expériences présentées au cours du prochain chapitre constituera le procédé analytique essentiel et sera envisagée en détail. Lorsque des anticorps sont dialysés contre une solution contenant l'haptène spécifique correspondant, le rapport de la concentration de l'haptène dans le compartiment contenant

les anticorps à la concentration dans le compartiment extérieur, tend vers une valeur d'équilibre, les anticorps «concentrant» l'haptène. La valeur du rapport des concentrations à l'équilibre est fonction de la quantité d'anticorps, de leur constante d'affinité et de la concentration d'haptène libre.

Nous avons utilisé comme haptène l'acide sulfanilique marqué par du soufre radioactif, couplé par diazotation à de la l-tyrosine. La radioactivité spécifique élevée de ce produit nous a permis d'effectuer les dialyses à l'équilibre à une concentration initiale d'haptène, dans les deux compartiments, inférieure à 10^{-7} M. De ce fait, dès cette phase de notre travail, la méthode avait sa sensibilité maximum. Mais comme nous n'avons déterminé le rapport d'équilibre qu'à cette concentration minimum d'haptène, il ne nous était pas possible de déduire de ce chiffre unique la quantité des anticorps et leur constante d'affinité.

La technique utilisée alors consistait à dialyser 2 ml de la fraction à analyser au contact de 2 ml de tampon phosphate contenant l'haptène radioactif. Après quarante huit heures sous agitation constante, l'équilibre est réalisé. La mesure de la radioactivité par unité de volume dans le sac à dialyse et hors du sac permet de définir le rapport cherché. En l'absence d'anticorps, ce rapport est égal à 1. Ce test ne peut être effectué dans de bonnes conditions qu'avec des préparations de globulines, l'albumine fixant l'haptène de façon non spécifique.

Résultats.

La cellulose couplée à l'acide sulfanilique fixe la totalité des anticorps ayant de l'affinité pour l'acide sulfanilique libre ou couplé par diazotation à la l-tyrosine. La totalité des anticorps anti AH et la presque totalité des anticorps «spécifiques pour AHD» passent à travers la colonne sans être retenus. L'ensemble des résultats est présenté dans les tableaux IV et V.

Tout d'abord, il faut remarquer que les titres observés par hémagglutination pour les différents groupes d'anticorps ne sauraient être proportionnels aux quantités d'anticorps réagissant. L'examen du tableau IV par exemple, montre que les anticorps «spécifiques pour AHD» élués de la colonne ont un titre de 10 et représentent 0,36 % des globulines. Le titre de 10 000 observé pour les anticorps anti AH dans la fraction 1 ne peut être dû à une quantité mille fois plus élevée d'anticorps.

TABLEAU IV
Analyse des globulines du lapin P 916

		Globulines initiales au 1/2	Fraction 1	Fraction A
d. o. à 280 m μ		18	17,6	0,065
Rapport mesuré par dialyse à l'équilibre		1,7	1	1,4
titres déterminés par hémag- glutination passive	anti AH	10 000	10 000	0
	«spécifiques pour AHD»	500	500	10
	anti ALD	50	100	20

Dans la première ligne sont indiquées les densités optiques (d.o.) des différentes fractions. Le rapport de la densité optique de la fraction A à celle des globulines initiales au 1/2 est de 0,36 % - Fraction 1 : globulines qui n'ont pas été retenues sur la colonne - Fraction A : globulines fixées puis spécifiquement éluées.

TABLEAU V
Analyse des globulines du lapin P 903

		Globulines initiales au 1/2	fraction 1	fraction A	fraction 1'	fraction A'
d.o. à 280 m μ		32	31	0,185	15	0,065
Rapport mesuré par dialyse à l'équilibre		2,2	1,28	1,53	1	1,22
titres déterminés par hémag- glutination passive	anti AH	2 000	2 000	0	1 000	0
	«spécifiques pour AHD»	1 000	1 000	50	200	0
	anti ALD	100	50	50		

La séparation obtenue par un premier passage des globulines du lapin P 903 sur la colonne n'ayant pas été complète, 2 ml de la fraction 1 ont été passés à nouveau sur une deuxième colonne identique et nous avons ainsi obtenu les fractions 1' (4 ml) et A' (2 ml). Le rapport de la densité optique (d.o.) des fractions A et A' à celle des globulines initiales au demi est de 0,77 %.

Le fait que la totalité des anticorps anti AH soit retrouvée dans la fraction 1 montre qu'aucun anticorps n'a d'affinité à la fois pour l'albumine humaine non conjuguée et pour l'haptène couplé à la cellulose. Les anticorps anti AH se comportent vis-à-vis de cette colonne comme des globulines non spécifiques. Leur absence totale dans la fraction A montre que les protéines de la fraction A sont en totalité des anticorps anti haptènes. Plus précisément, le titre des anticorps anti AH étant de 10 000 dans la fraction initiale (tableau IV) et inférieur à 10 dans la fraction A, la contamination des anticorps anti haptènes par des globulines non spécifiques est inférieure à 1 %.

La totalité des anticorps ayant de l'affinité pour l'acide sulfanilique diazoté peut être retenue par la colonne : en effet, les concentrations d'haptène sont égales des deux côtés de la membrane de dialyse pour la fraction 1 (tableau IV) et 1' (tableau V). Mais les valeurs du rapport des concentrations restent toujours inférieures dans les fractions A aux valeurs obtenues avec la fraction initiale ramenée au même volume. De nombreuses raisons peuvent être proposées pour expliquer ce fait : d'abord les six premiers millilitres seulement de l'éluat sont analysés, les fractions collectées ensuite contiennent encore des traces d'anticorps qui sont en quantités très faibles. Il est possible que ces anticorps difficilement éluables aient une affinité élevée. Peut-être une certaine partie des anticorps reste-t-elle fixée sur la cellulose et *LERMAN* avait observé que si la colonne ayant retenu les anticorps était laissée quelques heures à +4° C, il devenait pratiquement impossible d'éluer ces anticorps. Enfin, il faut tenir compte d'une certaine dénaturation qui peut survenir sur des solutions de protéines aussi diluées.

La constatation essentielle qu'appelle l'examen des tableaux IV et V est que les anticorps « spécifiques pour AHD » sont présents presque en totalité dans la fraction 1, c'est-à-dire dans une fraction qui n'est pas retenue par la colonne de cellulose spécifique et qui ne manifeste aucune affinité pour l'haptène par dialyse à l'équilibre. Par contre, les anticorps anti haptènes de la fraction A n'agglutinent les hématies sensibilisées par AHD ou ALD, qu'à des taux extrêmement faibles et d'ailleurs pratiquement identiques.

Ces titres sont si faibles que, même si ces anticorps étaient dix ou vingt fois plus abondants, le titre des anticorps « spécifiques pour AHD », mesuré sur l'antisérum non fractionné n'en serait pas modifié de façon significative, puisque le titre doit varier au moins d'un facteur 2 pour qu'une variation soit observée. Par conséquent, le titre mesuré

pour les anticorps «spécifiques pour AHD» est dû à des anticorps qui n'ont aucune affinité mesurable pour l'haptène, libre ou couplé à la tyrosine. Il faut supposer que ces anticorps qui n'ont pas réagi avec AH et qui sont sans affinité pour l'haptène, correspondent à des structures protéiques dont la configuration a été modifiée par suite de la diazotation.

2°) EPUISEMENT DES ANTICORPS «SPECIFIQUES POUR AHD» PAR UN TRES GRAND EXCES DE AH

Nous avons observé un fait expérimental qui indique que les anticorps «spécifiques pour AHD» ne sont pas dépourvus de toute réactivité pour l'albumine humaine non diazotée. Par définition, ces anticorps provoquent l'agglutination des hématies tannées et sensibilisées avec AHD lorsque tous les anticorps anti AH de l'antisérum ont été épuisés par une quantité d'albumine égale ou supérieure à l'équivalence. Si la quantité de AH ajoutée est égale à deux, cinq, dix, vingt fois l'équivalence, le titre des anticorps «spécifiques pour AHD» reste constant, et c'est ainsi que ce titre a été mesuré. Mais si on ajoute à certains sérums, cent, cinq cent ou mille fois la quantité minimum de AH nécessaire pour «épuiser» tous les anticorps anti AH, aucun anticorps «spécifique pour AHD» n'est plus détectable : en présence d'un très grand excès de AH, les anticorps «spécifiques pour AHD» sont neutralisés. Les concentrations de AH atteignent dans ces conditions de 2 à 20 mg par millilitre et l'inhibition observée pourrait être due à un effet de protection non spécifique. Il n'en est rien puisque des concentrations aussi élevées d'albumine humaine n'inhibent pas l'héماغglutination d'autres systèmes (protéines d'E. coli par exemple) et que cette inhibition ne se produit pas si de l'albumine de lapin est utilisée au lieu de l'albumine humaine. Cette inhibition totale n'est pas observée pour les antisérums provenant d'animaux hyperimmunisés. Notons que le Dr. CINADER à qui nous avons signalé cet effet, l'a également observé au cours de son travail sur les anticorps anti enzymes (CINADER et PEARCE, 1958).

Ce fait expérimental semble indiquer l'existence d'une réaction croisée entre les motifs antigéniques qui suscitent la formation des anticorps «spécifiques pour AHD» et certains motifs structuraux de l'albumine humaine.

3°) INFLUENCE DES CONDITIONS D'IMMUNISATION SUR LES PROPRIETES SPECIFIQUES DES SERUMS ANTI AHD

Dans les sérums d'animaux hyperimmunisés par des injections fréquemment répétées de AHD, nous avons identifié les anticorps anti AH, les anticorps «spécifiques pour AHD» et les anticorps anti haptènes, ces derniers étant mis en évidence par dialyse à l'équilibre ou par adsorption spécifique sur colonne de cellulose couplée à l'haptène. Nous avons repris à l'aide de ces techniques l'étude des antisérums dont l'analyse a fait l'objet de la première partie de ce chapitre. Dans les conditions d'immunisation de ces expériences, même lorsque les injections primaires et secondaires étaient effectuées avec AHD (lot II) aucun anticorps anti haptène n'a pu être détecté.

Afin d'étudier les conditions d'apparition de ces différents types d'anticorps nous avons immunisé trois lapins en injectant par voie intraveineuse, tous les cinq jours pendant quatre semaines, 10 mg de AHD en solution. Des prises de sang étaient effectuées avant chaque injection. Dans ces conditions, on observe un accroissement progressif des trois catégories d'anticorps, les anticorps anti haptènes devenant détectables, par dialyse à l'équilibre, au plus tôt après la troisième injection. A la fin de cette période, le titre des anticorps anti AH définis par hémagglutination passive est inférieur de deux à cinq fois à celui obtenu à la suite de deux injections d'antigène espacées de quelques semaines. Le titre des anticorps «spécifiques pour AHD» est un peu plus élevé qu'après deux injections espacées. Les globulines préparées à partir de ces immunosérums concentrent fortement l'haptène. Les propriétés spécifiques des immunosérums sont donc très différentes selon les conditions d'immunisation.

Ces expériences indiquent que des injections fréquemment répétées de AHD sont nécessaires pour qu'apparaissent les anticorps anti haptènes et en particulier qu'une immunisation consistant en deux injections espacées d'antigène soluble est insuffisante pour susciter la formation, en quantité détectable, d'anticorps anti haptènes.

CONCLUSIONS DE L'ETUDE DES ANTICORPS ANTI AZOPROTEINES

Rappelons les résultats obtenus lorsque les globulines d'un animal hyperimmunisé avec AHD sont fractionnées par adsorption spécifique sur une colonne de cellulose chimiquement couplée à l'haptène. La

fraction qui n'est pas retenue sur la colonne ne concentre plus l'haptène par dialyse à l'équilibre; cette fraction présente le même titre que les globulines initiales pour les anticorps anti AH et pour les anticorps «spécifiques pour AHD». Il apparaît ainsi clairement que les anticorps «spécifiques pour AHD» sont sans affinité détectable pour l'haptène. Les déterminants antigéniques qui ont provoqué leur apparition ne sont donc pas les motifs hapténiques mais, nécessairement, des motifs protéiniques. L'absence de ces motifs, ou tout au moins de motifs analogues, sur la protéine non diazotée ne peut donc pas être affirmée avec autant de certitude que s'il s'était agi de motifs hapténiques.

Il est vrai que, par définition, les anticorps «spécifiques pour AHD» sont ceux qui, après épuisement de l'antisérum par AH, agglutinent les hématies tannées et sensibilisées avec AHD. Mais nous avons vu qu'en présence d'un très grand excès de AH, la réaction de ces anticorps avec AHD pouvait cependant être inhibée. Ce fait suggère qu'il pourrait exister des analogies entre certains motifs structuraux de l'albumine humaine non diazotée et les configurations protéiniques responsables de l'apparition des anticorps «spécifiques pour AHD». Si les anticorps «spécifiques pour AHD» présentent une affinité très faible pour AH, l'albumine humaine pourrait, à des concentrations extrêmement élevées, prévenir toute combinaison de ces anticorps avec AHD, mais, dans les conditions normales, aucune interaction ne serait observée. Mais il n'est pas possible de confirmer ou d'écarter cette interprétation dans la mesure où l'on utilise des techniques qui, comme l'hémagglutination passive, ne peuvent apporter aucune donnée sur la configuration des sites et sur l'énergie des liaisons spécifiques qui s'établissent entre les divers éléments du système envisagé.

III - CONCLUSIONS.

Les résultats obtenus au cours de l'étude du rappel hétérologue sont les suivants : l'injection de AHD à un animal, préalablement immunisé avec AH, ne déclenche une réaction de rappel que pour les anticorps anti AH. L'injection de AH effectuée secondairement à des injections de AHD entraîne la formation, dans les délais d'une réaction de rappel, d'anticorps anti AH et d'anticorps «spécifiques pour AHD». Les expériences de contrôle nous ont montré que si les deux antigènes successivement injectés sont entièrement différents, la synthèse des anticorps

spécifiques du premier antigène n'est pas provoquée par l'injection du second.

Il semble donc qu'à la suite d'un premier contact avec un antigène l'individu acquiert une information structurale qui peut être spécifiquement réexprimée au cours d'une réaction de rappel provoquée non seulement par ce même antigène, mais aussi par un antigène différent, à condition qu'il présente des structures analogues.

Malgré la netteté et la régularité de ce résultat global, il n'est pas possible de donner de ces faits une interprétation précise au niveau moléculaire. En effet, l'étude analytique des anticorps anti azoprotéines révèle que les anticorps «spécifiques pour AHD» sont des anticorps anti protéines. Or, nous avons vu que, compte tenu des techniques utilisées, les résultats obtenus suggèrent, mais ne permettent pas de prouver, que les motifs qui provoquent la formation de ces anticorps présentent des analogies avec des configurations structurales présentes dans l'albumine non diazotée. En l'absence de données précises sur l'existence de telles relations structurales, le fait que l'injection de AH à un animal préalablement immunisé avec AHD entraîne la formation d'anticorps «spécifiques pour AHD» ne peut donner lieu à une interprétation unique.

Une autre source d'ambiguïté tient à notre ignorance du sort de la molécule d'antigène dans l'organisme. On doit se demander en effet si la molécule de AHD est ou non fragmentée dans l'organisme avant d'exercer son rôle immunogène.

La labilité des composés azoïques *in vivo* a été démontrée par les travaux de M. et Mme J. TREFOUEL, NITTI et BOVET (1935-1938) et de Mlle Y. ARMAND (thèse 1939). Mais il est possible que l'immunisation soit provoquée par les très faibles quantités d'azoprotéines qui sont retenues au niveau de certains organites subcellulaires. Des traces d'haptènes conjugués par une liaison azoïque à des fragments peptidiques ont pu être mises en évidence, plusieurs mois après l'injection d'une azoprotéine (HAUROWITZ et WALTER, 1955, INGRAHAM, 1955). Quant aux structures protéiques elles-mêmes, elles sont rapidement dégradées dans l'organisme. Les expériences de LAPRESLE (1957) suggèrent que l'albumine humaine pourrait exercer son action immunogène par l'intermédiaire d'au moins trois fragments qu'il est possible d'obtenir par dégradation enzymatique *in vitro*.

Si les déterminants antigéniques correspondant aux anticorps «spécifiques pour AHD» agissaient alors qu'ils sont déjà séparés des autres motifs caractéristiques de l'albumine humaine et s'ils ne présentaient pas d'analogie structurale avec ces motifs, les observations relatives

à l'injection successive de AHD puis de AH seraient en contradiction avec les résultats de nos expériences de contrôle traduisant la spécificité du phénomène de rappel. Quelle que soit l'hypothèse faite sur le devenir de l'antigène dans l'organisme, cette contradiction n'existe plus si l'albumine humaine présente des analogies structurales avec les déterminants antigéniques de AHD.

Cette discussion fait apparaître qu'une connaissance précise des éléments de structure antigénique effectivement engagés dans les réactions du système en cause semble indispensable à l'interprétation du rappel hétérologue.

Deux groupes d'auteurs ont, au cours de ces toutes dernières années, étudié la nature des anticorps formés à la suite d'injections successives d'antigènes présentant entre eux des réactions croisées : *DAVENPORT*, *HENNESSY* et collaborateurs (1953 à 1956) à l'occasion d'une étude immunologique de l'épidémiologie de la grippe; *DIXON* et *MAURER* (1955) au cours d'une étude systématique réalisée avec des protéines d'origines animales différentes. Nous avons eu connaissance de ces travaux au moment où nous obtenions les premiers résultats de nos expériences. Les résultats de *DAVENPORT* et *HENNESSY*, confirmèrent nos observations. Une partie des conclusions de *DIXON* et *MAURER* était en contradiction avec les nôtres.

Les infections successives par des virus de la grippe présentant entre eux des réactions croisées réalisent les conditions mêmes du rappel hétérologue. *DAVENPORT* et *HENNESSY* ont observé qu'au cours de la convalescence d'une grippe prédominent les anticorps spécifiques, non pas du virus actuel, mais des virus qui avaient causé les premières infections grippales au cours de l'enfance de l'individu. Ces observations ont été confirmées en analysant la réponse à des injections successives de virus de différents types. La conclusion de ces auteurs est que seul le premier antigène injecté à un individu est capable de produire un effet maximum sur les centres formateurs d'anticorps; les antigènes de structure voisine injectés par la suite n'exercent qu'un effet moindre sur un système formateur qui a reçu, tout au moins en ce qui concerne cette famille d'antigène, une « orientation » définitive.

Nous résumerons l'essentiel du travail de *DIXON* et *MAURER* en décrivant l'une de leurs expériences : l'immunisation primaire est réalisée avec de la sérum albumine de bœuf, l'injection de rappel avec de la sérum albumine humaine. Les quantités des trois types d'anticorps suivants ont été déterminées par les méthodes précises de l'immunochimie quantitative : les anticorps réagissant à la fois avec les

deux antigènes, les anticorps anti albumine bovine ne réagissant pas avec l'albumine humaine, et les anticorps anti albumine humaine ne réagissant pas avec l'albumine bovine. L'injection secondaire d'albumine humaine stimule la production de ces trois types d'anticorps. Le fait que des anticorps spécifiques pour l'albumine humaine ont été synthétisés de façon significativement plus rapide et plus intense qu'au cours d'une réponse primaire normale semble en contradiction avec nos propres observations : l'injection de AHD consécutive à l'injection de AH n'entraîne pas l'apparition d'anticorps « spécifiques pour AHD » (lot 1). Par contre, l'accroissement des anticorps réagissant avec les deux antigènes et des anticorps spécifiques pour l'albumine bovine est conforme aux résultats que nous avons présentés.

Nos résultats, ainsi que ceux de *DAVENPORT* et *HENNESSY* et de *DIXON* et *MAURER*, sont donc essentiellement en harmonie en ce qu'ils révèlent un fait certainement significatif, à savoir qu'un rappel hétérologue se traduit au moins en partie par la réexpression d'une information antérieurement acquise. Mais il est clair qu'une interprétation précise de ce que l'on est en droit d'appeler « un effet de mémoire », exigerait que soient définies les relations ou les différences que présentent entre elles les structures responsables respectivement de l'impression primaire et du rappel hétérologue. Par les techniques employées aussi bien que par la nature des antigènes en cause, nos expériences ainsi que celles que nous venons de citer ne permettaient pas d'atteindre ce but. Les conditions d'un abord expérimental beaucoup plus précis seront réalisées par l'étude des anticorps anti haptènes au moyen de techniques permettant de définir les constantes physico-chimiques de la réaction haptène-anticorps.

ANALYSE PAR LA MÉTHODE DE DIALYSE A L'ÉQUILIBRE DES ANTICORPS HOMOLOGUES D'UN HAPTÈNE DONNÉ

Les premières études du phénomène de rappel hétérologue que nous venons de rapporter révèlent la nécessité d'utiliser des techniques qui par leur nature ne laissent aucune ambiguïté quant aux structures effectivement en cause dans les systèmes antigènes anticorps employés. En outre, il est clair qu'une mesure quantitative des affinités mises en jeu permettrait seule d'arriver à des interprétations précises. Nous avons donc repris l'étude du rappel hétérologue en utilisant pour les injections primaires et secondaires des protéines couplées à différents haptènes présentant des structures analogues. Ainsi, les déterminants antigéniques responsables des réactions croisées sont connus. Quant à l'analyse, elle a été effectuée par la technique de dialyse à l'équilibre qui permet de déterminer les caractéristiques physico chimiques de la réaction réversible entre anticorps et haptènes.

Dans une première série d'essais, nous avons étudié par ces techniques la composition et les propriétés des populations d'anticorps obtenues par immunisation avec un seul antigène (immunisations homologues), en nous attachant tout spécialement à définir les différences observables selon que l'analyse est effectuée avec l'haptène homologue ou avec un haptène de structure voisine. C'est cette première partie de nos recherches sur les anticorps anti haptènes qui sera exposée dans ce chapitre. En raison de l'hétérogénéité des anticorps, la situation s'est révélée très complexe. Nous verrons cependant qu'il est toujours possible, pour des anticorps donnés, de distinguer parmi divers haptènes, l'haptène homologue.

I - GENERALITES SUR LA METHODE DE DIALYSE A L'EQUILIBRE CHOIX DES HAPTENES UTILISES

Si la réaction antigène-anticorps, *in vitro*, a fait l'objet d'une masse considérable de travaux, la première étape de cette réaction, c'est-à-dire la combinaison initiale entre l'antigène et l'anticorps, n'a été que très peu étudiée. Une des meilleures méthodes pour réaliser une telle analyse est la technique de la dialyse à l'équilibre. En effet, les complexes formés entre les anticorps et l'haptène sont solubles et, par l'artifice de la membrane perméable seulement aux petites molécules, il est possible de déterminer la quantité d'haptène lié aux anticorps pour différentes concentrations d'haptène libre, lorsque l'équilibre entre les deux compartiments est atteint. Ces données expérimentales permettent de calculer la constante d'association du système haptène anticorps et l'énergie libre de cette association.

C'est en 1932 que *MARRACK* et *SMITH* ont appliqué pour la première fois cette méthode à l'analyse d'anticorps anti haptènes. Ces auteurs ont montré que les globulines préparées à partir du sérum d'un lapin hyperimmunisé avec des protéines sériques de cheval couplées par diazotation à l'acide arsanilique se combinent spécifiquement à l'acide phényl azo para benzène arsonique. En 1933, *HAUROWITZ* et *BREINL* mettaient de la même façon en évidence la combinaison de l'acide arsanilique avec un antisérum spécifique. Plus récemment, *EISEN* et *KARUSH* (1949), *CARSTEN* et *EISEN* (1955), *KARUSH* (1956), *NISONOFF* et *PRESSMAN* (1958), ont apporté, grâce à cette méthode qu'ils ont grandement améliorée, une série de déterminations précises. Selon le dernier travail de *KARUSH*, par exemple, la valence des anticorps a pu être fixée à 2 avec une précision de $\pm 5\%$; l'énergie libre de la liaison, déterminée à 25°, entre l'haptène choisi [D-phényl (p-(p dimethyl amino benzène azo) - benzoyl amino) - acétate] et l'anticorps correspondant ne varie selon les lots d'anticorps, obtenus par hyperimmunisation, qu'entre 6,7 et 7,8 kilo calories par mole d'haptène. En déterminant la variation de cette énergie en fonction de la température, cet auteur a pu montrer que la variation d'entropie au cours de cette combinaison est pratiquement nulle. La contribution énergétique de différentes parties de cet haptène complexe a pu être déterminée et ainsi la dimension maximum des sites spécifiques de l'anticorps a pu être estimée comme étant de l'ordre de la taille de cet haptène. Enfin, les anticorps se sont révélés comme constituant une population hétérogène quant à l'affinité manifestée par leurs sites spécifiques. Certains de

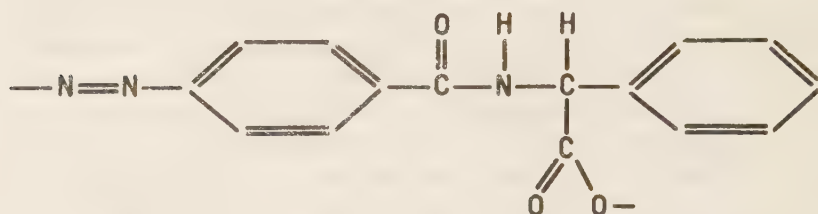
ces résultats ne sont pas nouveaux, ils ont néanmoins été ainsi confirmés par une méthode directe et précise. Il faut mettre en parallèle avec ces études effectuées par dialyse à l'équilibre, les expériences réalisées par DOTY et EPSTEIN (1954) grâce à la méthode de diffusion latérale de la lumière sur un système haptène anticorps.

Les haptènes que nous avons utilisés sont l'acide para amino benzène sulfonique (acide sulfanilique), l'acide méta amino benzène sulfonique (acide méthanilique) et l'acide para amino benzène arsonique (acide arsanilique ou anilarsinique). Les raisons de ce choix ont été tirées du travail de LANDSTEINER (1945 p. 164-169). Une des constatations fondamentales faites par cet auteur était que la nature du groupe acide de l'haptène jouait dans la spécificité un rôle déterminant alors que la position de ce radical acide, si elle avait un effet marqué, ne présentait pas ce caractère exclusif. Par exemple, un sérum obtenu par immunisation avec une protéine couplée par diazotation à l'acide sulfanilique donnait, au contact d'une protéine différente couplée de la même manière à différents haptènes, un précipité important, faible ou nul selon que l'haptène était l'acide sulfanilique, l'acide méthanilique ou l'acide arsanilique.

Si nous avons utilisé comme antigènes des protéines couplées à ces différents acides, nous ne pouvions nous contenter de ces acides pour effectuer nos analyses *in vitro*. En effet, les sites spécifiques des anticorps sont sensiblement plus grands que ces cycles benzéniques ainsi substitués et les constantes d'association déterminées avec ces haptènes seraient faibles par rapport à celles qui correspondraient à une structure spécifique complémentaire plus étendue. C'est pourquoi nous avons couplé ces différents acides, par diazotation, à la l-tyrosine et à la l-histidine, PAULY (1915) ayant montré que le sel de diazonium, dans sa réaction avec les protéines, se fixait préférentiellement à la tyrosine et à l'histidine. Les dimensions des haptènes ainsi réalisés doivent être très peu inférieures à celles des motifs antigéniques originaux comme semblent l'indiquer les travaux récents de KABAT (1956) et de KARUSH (1956).

KABAT a étudié l'inhibition de la précipitation du système dextrane anticorps par des polyhexoses de complexité croissante et montré que l'effet inhibiteur croît dans l'ordre suivant, isomaltotriose, isomaltotétraose, isomaltopentaose et isomaltohexaose. Mais déjà pour le tétraose, l'effet inhibiteur est très important et il ne croît que de plus en plus faiblement lorsque la longueur de la chaîne augmente. Les sites se sont révélés hétérogènes quant à leur dimension, variant au moins de celle d'un triose à celle d'un hexaose, la proportion de ces différents sites étant variable d'un individu à un autre.

Nous avons déjà rapporté une partie des expériences de *KARUSH* : le fragment D phényl (p-azo-benzoyl-amino) acétate de l'haptène complet



se combine avec l'anticorps avec une énergie de liaison presque égale à celle de l'haptène complet et par conséquent la taille du site spécifique de l'anticorps ne doit guère être supérieure à celle de ce fragment. La correspondance entre ces deux résultats est donc très remarquable.

Les observations de *SINGER* (1957) méritent d'être signalées ici, bien qu'elles soient beaucoup moins précises car les motifs antigéniques sont dans son étude les motifs présentés par des protéines natives. Il a pu néanmoins préciser qu'un seul groupe carboxyle semblait jouer un rôle décisif dans chaque liaison de l'antigène avec l'anticorps, rendant compte ainsi de plus de la moitié de l'énergie libre de cette liaison. Cet argument tend également à assigner aux motifs spécifiques une dimension assez faible.

Dans les expériences de *KARUSH*, d'*EISEN* et de *CARSTEN*, la concentration des haptènes qui présentaient une forte coloration, était mesurée par spectrophotométrie. Il leur a été ainsi possible d'effectuer leurs analyses à des concentrations finales d'haptène libre variant de $5 \cdot 10^{-6}$ M à 10^{-4} M environ. Bien que nos haptènes présentant une liaison azoïque aient une coloration intense, nous avons utilisé des haptènes radioactifs, ce qui nous a permis de mesurer les déplacements d'équilibre jusqu'à des concentrations aussi faibles que $3 \cdot 10^{-8}$ M. La sensibilité de la méthode était ainsi grandement accrue et nous pouvions effectuer nos observations sur une zone de concentration plus étendue. Nous avons utilisé de l'acide sulfanilique marqué au soufre 35 et d'autre part, de la ^{14}C l-tyrosine et de la ^{14}C -l-histidine que nous avons couplées par diazotation à de l'acide sulfanilique, de l'acide méthanilique ou de l'acide arsani-

Préparation des antigènes.

Nous avons utilisé comme antigène de l'albumine humaine couplée par diazotation à de l'acide sulfanilique, de l'acide métanilique ou de l'acide arsanilique. Les acides arylaminés ont été analysés par chromatographie en utilisant comme solvant le mélange propanol-eau (80/20). Ils se sont révélés chromatographiquement purs.

L'albumine humaine est la même que celle utilisée dans nos expériences antérieures. La technique de diazotation a été décrite au début du chapitre précédent; la seule modification que nous avons apportée a consisté à faire réagir avec l'albumine une quantité de sel de diazonium telle que, si le rendement avait été de 100 %, soixante groupes sulfoniques ou arsoniques et non plus quarante auraient été fixés en moyenne à chaque molécule d'albumine. L'accroissement de la coloration, mesurée par photométrie, étant de 50 %, le rendement de la réaction de diazotation dans ces nouvelles conditions ne semble pas avoir été modifié, et c'est donc dix neuf à vingt radicaux hapténiques qui sont en moyenne fixés par molécule de protéine au lieu de treize précédemment.

Nous désignerons ces trois antigènes par les sigles suivants : AHpS, AHmS, AHpAS, selon que l'albumine humaine est couplée par diazotation à des radicaux benzène parasulfonique, benzène métasulfonique ou benzène paraarsonique.

Conditions de la synthèse et de la purification des haptènes.

Nous avons préparé un certain nombre d'haptènes en couplant à de la l-tyrosine ou de la l-histidine les sels de diazonium des acides sulfanilique, métanilique ou arsanilique ou de l'aniline. La tyrosine et l'histidine sont susceptibles de s'unir par diazotation à un ou deux radicaux arylaminés. Nous avons choisi de préparer les composés mono-azoïques.

Si les réactions de diazotation se produisent dans des conditions analogues avec la tyrosine et l'histidine ou avec des protéines, la purification des azoïques de faible poids moléculaire pose des problèmes particuliers. Etant donné que la synthèse des composés radioactifs a dû être effectuée à partir de quelques dixièmes de milligramme de substance, nous avons dû envisager les possibilités de séparation par chromatographie.

Afin de déterminer les proportions relatives de tyrosine ou d'histidine d'une part et d'arylacide d'autre part qu'il faut faire réagir pour former préférentiellement le composé monosubstitué, nous avons effectué une série de réactions de diazotation, les réactifs étant dans la proportion d'une mole d'acide aminé pour une demie, une, deux ou quatre moles d'acide sulfanilique que nous avons rendu faiblement radioactif par addition de quantités impondérables d'acide ^{35}S sulfanilique. Les produits de ces réactions ont été analysés par chromatographie descendante en utilisant comme solvant le mélange propanol eau (80/20) parfois le mélange butanol acide acétique ou une solution 0,1 M de PO_4KH_2 . Nous avons également analysé ces produits par électrophorèse sur papier (méthode de *MACHEBOEUF* et collaborateurs, 1953). Après élution, les diverses fractions ainsi obtenues ont été analysées au spectrophotomètre enregistreur.

Les taches colorées, qui seules nous intéressent, migrent très lentement sur les chromatogrammes : il est nécessaire de laisser s'écouler le solvant au moins quarante huit à soixante douze heures pour avoir une bonne séparation. Dans le cas de la tyrosine, quelles que soient les proportions de cet acide aminé et du sel de diazonium de l'acide sulfanilique réagissants, on identifie sur les chromatogrammes trois taches colorées. L'une migre relativement vite, est orangée en milieu alcalin, jaune en milieu acide, contient de l'acide sulfanilique (tache radioactive) et de la tyrosine (révélée par la ninhydrine à chaud). Une deuxième tache qui présente les mêmes caractéristiques migre beaucoup plus lentement. Enfin les produits colorés restant sur la tache de départ ont une couleur brunâtre, invariable en fonction du pH. Lorsque la quantité d'acide sulfanilique réagissant avec une quantité fixe de tyrosine augmente, l'intensité de la tache relativement rapide diminue progressivement alors que celle de la tache très lente s'accroît.

Les trois fractions obtenues par chromatographie ont, après élution, été analysées au spectrophotomètre enregistreur, en présence d'ammoniaque à concentration finale M/100. Le produit qui reste sur la ligne de départ présente une absorption progressivement décroissante entre 220 et 700 μ . Le spectre des deux produits mobiles présente trois maximums pour 240, 328 et 485 μ .

Nous avons analysé ces mêmes fractions après élution, par électrophorèse sur papier en tampon véronal à pH 8,6. La séparation de ces trois composés se fait en ordre inverse : la fraction immobile par chromatographie se dissocie à l'électrophorèse en plusieurs fractions de mobilité élevée; puis vient le composé très lent et enfin, mais avec une mobilité encore non négligeable, le composé précédemment considéré comme relativement rapide.

Ces divers arguments expérimentaux indiquent que la tache lente (par chromatographie) correspond vraisemblablement au composé bis azoïque et que la tache plus rapide correspond au composé mono azoïque. La preuve de l'exactitude de cette hypothèse sera apportée, tout au moins en ce qui concerne le dérivé monosubstitué, par l'analyse élémentaire qui a été effectuée sur les haptènes non radioactifs préparés en quantité importante. Le rapport optimum pour obtenir le composé monosubstitué est de une mole d'arylacide pour deux moles de tyrosine.

Nous avons également effectué la synthèse des azohistidines et leur analyse a été conduite dans les mêmes conditions avec des résultats essentiellement analogues. Mais les deux produits isolés par chromatographie, correspondant aux composés mono et disubstitués, présentent chacun un seul maximum d'absorption à 395 et 490 $m\mu$ respectivement, en plus du maximum toujours observé aux très courtes longueurs d'onde (240 $m\mu$). Les azotyrosines mono ou disubstituées, rappelons le, présentaient chacune, outre le maximum à 240 $m\mu$, deux maximums d'absorption à 328 et 485 $m\mu$.

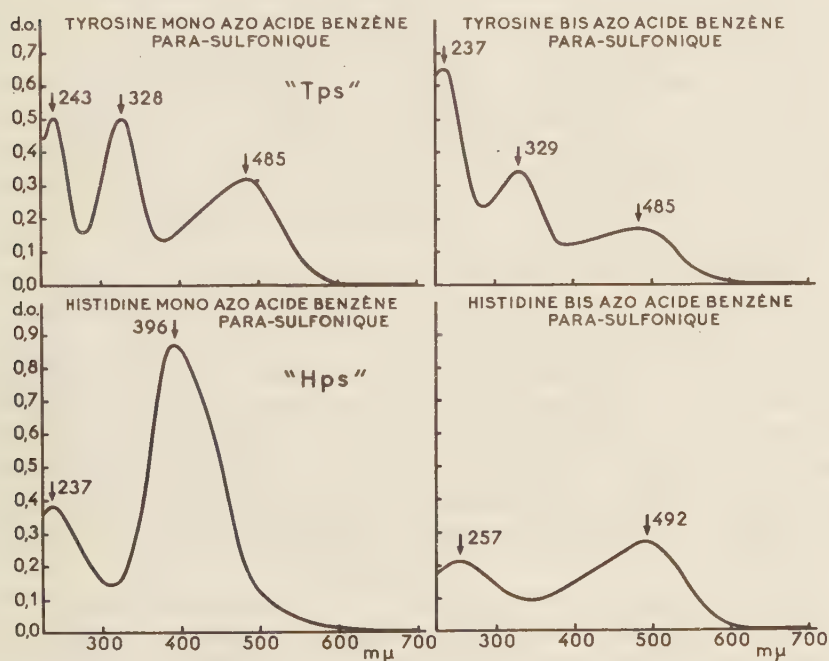


Figure 6. - Spectres d'absorption déterminés avec un spectrophotomètre enregistreur

Les spectres caractéristiques de ces quatre composés azoïques de l'acide sulfanilique sont présentés dans la figure 6.

Nos conclusions quant aux spectres d'absorption de ces composés azoïques sont en partie en contradiction avec celles de *HIGGINS* et *FRAZER* (1952). Ces auteurs ont étudié la diazotation de l'histidine et de la tyrosine par des quantités croissantes de sel de diazonium de l'acide sulfanilique. Le produit final de ces réactions, sans aucune purification, a été analysé par spectrophotométrie. Ces auteurs ont ainsi reconnu que le composé mono substitué de l'histidine présentait un maximum d'absorption à 380 $m\mu$ et le composé disubstitué un maximum à 490 $m\mu$. Ils ont supposé que les composés mono et disubstitués de la tyrosine étaient de même caractérisés chacun par un seul maximum d'absorption à 325 ou 480 $m\mu$ respectivement. Le fait que ces deux maximums soient présents quelles que soient les proportions des deux réactifs était interprété comme traduisant l'impossibilité d'obtenir l'un de ces composés à l'exclusion de l'autre.

Synthèse des haptènes radioactifs.

Acide sulfanilique radioactif - La synthèse de l'acide sulfanilique marqué au soufre 35 dans son groupe sulfonique a été réalisée par *M. PICHAT* du Commissariat à l'Energie Atomique. L'activité spécifique initiale, particulièrement élevée, était de 87 mc par mM. Nous avons constaté que ce produit était chromatographiquement pur.

Tyrosine monoazo acide ^{35}S benzène parasulfonique - Deux milligrammes d'acide sulfanilique radioactif sont dissous dans deux millilitres d'eau. On ajoute, à froid, 0,05 ml d'acide chlorhydrique N puis 0,1 ml de nitrite de sodium à 1 %, qui se trouve ainsi en léger excès. Cet excès est éliminé au bout de dix minutes par addition de quelques gouttes d'acide sulfamique à 1 %. Le sel de diazonium de l'acide sulfanilique est alors ajouté, toujours à froid, à 3,8 mg de l-tyrosine en solution dans 10 ml d'un tampon carbonate bicarbonate (pH 9). On laisse ce mélange au moins deux heures à froid pour que la réaction soit complète.

Composés azoïques de la ^{14}C -l-tyrosine - La l-tyrosine radioactive provient du centre d'Amersham : elle a été obtenue à partir d'algues (*Chlorella*) cultivées avec du bicarbonate ^{14}C comme seule source de carbone. Son activité spécifique est de 11,8 mc par mM.

Le sel de diazonium des acides sulfanilique, métanilique ou arsanilique est préparé dans les conditions précédemment décrites, à partir de quelques dizaines de milligrammes de ces acides. Le volume final de cette solution est ajusté de façon que 0,2 ml corresponde à 73 μg d'acide sulfanilique ou métanilique ou à 91,5 μg d'acide arsanilique. Ce volume de 0,2 ml de la solution de sels de diazonium est ajouté à 0,2 ml d'une solution alcaline de ^{14}C -l-tyrosine représentant 153 μg de cet acide aminé, soit 10 μc . On laisse ces solutions quelques heures à froid avant de commencer la purification des azo tyrosines.

Composés azoïques de la ^{14}C -l-histidine - La l-histidine radioactive provient du centre d'Amersham : elle est marquée au niveau du carbone 2 du cycle. Son activité spécifique est de 6,03 mc/mM. La diazotation a été effectuée dans les mêmes conditions que pour la tyrosine radioactive.

Purification des composés azoïques - Ces solutions radioactives (^{35}S ou ^{14}C) sont alors en totalité déposées en trait continu sur une ou plusieurs feuilles de papier Whatman 2 et chromatographiées, le solvant étant le mélange propanol eau (80/20). La tache colorée dont le déplacement est le plus rapide est ensuite éluee par de l'eau.

Les concentrations en azotyrosine des solutions obtenues sont alors déterminées par mesure de leur radioactivité, l'activité spécifique de la tyrosine ou de l'acide sulfanilique étant connue. Une analyse spectrophotométrique de ces solutions a été effectuée.

Synthèse des haptènes non radioactifs.

L'analyse des anticorps par dialyse à l'équilibre nécessitant l'usage non seulement de concentrations très faibles d'haptènes mais aussi de concentrations élevées (10^{-2} M), il a été nécessaire également de préparer des quantités importantes d'haptènes non radioactifs. Nous avons fait réagir 9 mM de sel de diazonium de divers acides arylaminés avec 18 mM de l-tyrosine. Nous n'avons pas préparé les dérivés correspondants de l'histidine.

La purification du composé disubstitué de la tyrosine et de l'acide sulfanilique a été réalisée par PAULY (1915) grâce à une acidification ménagée. La réaction avait été effectuée à partir de 20 mM d'acide sulfanilique et de 10 mM de tyrosine : l'analyse élémentaire de la substance obtenue par précipitation en milieu acide correspondait

exactement au composé disubstitué. Nous n'avons pas réussi à précipiter dans nos conditions expérimentales le composé monosubstitué par cette technique, à partir du milieu réactionnel.

Le pH du milieu où s'est effectuée la réaction est d'abord ramené à 7; on élimine ainsi en partie par précipitation l'excès de tyrosine qui n'a pas réagi. La solution est alors chromatographiée : nous avons utilisé du papier Whatman 3, très épais, de façon à pouvoir déposer en trait continu sur un nombre de feuilles relativement restreint une quantité suffisante de produit. Chaque chromatographie, effectuée en système descendant, a été poursuivie trois jours pour les dérivés sulfoniques, cinq jours pour les dérivés arsoniques plus lents, afin d'avoir une bonne séparation. La tache colorée la plus rapide a été découpée puis élue dans l'eau. Après avoir réduit par évaporation jusqu'à quelques centimètres cubes le volume de ces solutions, nous avons effectué une précipitation par acidification progressive à pH 3. Après dessiccation prolongée, l'analyse élémentaire de ces précipités a été effectuée*. Le tableau suivant donne les résultats de cette analyse pour le dérivé de l'acide parasulfonique.

	Résultats de l'analyse	Composition théorique du dérivé	
		monosubstitué	disubstitué
C	45. 08	49. 3	45. 9
H	4. 14	4. 1	3. 46
S	7. 79	8. 76	11. 66

Un dosage d'arsenic* a été effectué pour le dérivé de l'acide arsanilique. Le pourcentage est égal à 17,66. Il est théoriquement de 18,3 pour le composé monosubstitué, de 23,55 pour le composé disubstitué.

Les spectres de ces différents produits ont été obtenus. Ils présentent dans tous les cas trois maximums à 240, 328 et 485 m μ . Les écarts observés entre les valeurs des longueurs d'onde des maximums d'absorption ont été, d'un produit à un autre, inférieurs à 5 m μ . Nous ne pouvons pas les considérer comme significatifs.

Il est essentiel pour nos analyses par dialyse à l'équilibre que les concentrations de ces différents composés, radioactifs ou non, soient exactement connues : la concentration des composés marqués au soufre

* Nous remercions M. BAGILET du service de Chimie Thérapeutique à l'Institut Pasteur d'avoir bien voulu se charger de ces analyses.

³⁵S ou au carbone ¹⁴C a été déterminée à partir de l'activité spécifique de l'acide sulfanilique ou de la tyrosine; la concentration des composés non radioactifs a été mesurée par l'analyse élémentaire. Pour chacune de ces substances, nous avons déterminé le spectre d'absorption sur une dilution connue. Le coefficient d'extinction moléculaire, pour TpS et TmS, a ainsi été trouvé égal à $1,4 \cdot 10^4$ ($\lambda = 328 \text{ m}\mu$, $\text{NH}_4\text{OH N/100}$).

Tyrosine azo benzène - Nous avons également préparé la l-tyrosine azo benzène. Cette préparation présente quelques particularités : il est nécessaire d'alcaliniser fortement (pH 11 à 12) par une solution de soude pour que le couplage entre le sel diazonium et la tyrosine s'effectue (GRIGNARD). Après dessiccation sous vide, une première purification a été effectuée par extraction par l'acétone. Cette solution acétonique a été fractionnée par chromatographie : une tache brunâtre, de couleur indépendante du pH et ne réagissant pas avec la ninhydrine, migre avec le front du solvant. Une seule autre tache colorée, présentant toutes les réactions des azotyrosines, migre avec un R_f de 0,8. Le produit obtenu par élution de cette tache contenait 11,60 % d'azote. Le composé monosubstitué en contient théoriquement 14,74 %, le disubstitué 17,99 %. Le spectre présente trois maximums pour les mêmes longueurs d'onde que les composés précédents.

La l-tyrosine monoazo benzène p-sulfonique, la l-tyrosine monoazo benzène m-sulfonique, la l-tyrosine monoazo benzène p-arsonique seront désignées par les sigles suivants : TpS, TmS, TpAs. De même, les monoazo-histidines seront désignées par HpS, HmS ou HpAs. Si ces haptènes sont radioactifs, ces sigles seront précédés selon le cas de ¹⁴C ou de ³⁵S.

III - IMMUNISATIONS - PREPARATION DES GLOBULINES

Immunisations.

Au cours du chapitre précédent, nous avons vu qu'il était nécessaire d'effectuer une série d'injections, à quelques jours d'intervalle, de protéines diazotées pour que les anticorps anti haptènes deviennent détectables. Afin d'obtenir à la suite d'une injection unique une quantité d'anticorps aisément analysable, nous avons utilisé pour l'injection primaire l'adjuvant décrit par FREUND (1944). L'injection secondaire,

effectuée quatre semaines après, a consisté dans tous les cas en 20 mg d'antigène en solution dans de l'eau isotonique (Cl Na 9 %), par voie intra veineuse. Cette injection était précédée, une demi-heure auparavant, d'une injection sous-cutanée de quelques milligrammes du même antigène.

La composition de l'adjuvant utilisé pour l'injection primaire était la suivante : 10 ml d'huile (Ondina 17 Shell), 1 ml de Span 80, 3 ml de solution aqueuse de l'antigène à 1 % et 20 mg de BCG. L'émulsion est réalisée par une agitation énergique (*VIRTISS*). Un millilitre de cette émulsion, correspondant à 3 mg d'antigène, est injecté à chaque lapin par voie sous-cutanée.

Prises de sang - Préparation des globulines.

La veille de l'injection secondaire, environ 30 à 35 ml de sang sont prélevés. Six jours après l'injection secondaire, les animaux sont saignés à blanc.

Chaque sérum est décanté puis les globulines sont précipitées par addition à un volume de sérum de 1,3 volumes de sulfate d'ammonium 3 M. Deux lavages du précipité sont effectués avec une solution 1,75 M de sulfate d'ammonium. Le précipité est alors dissous dans un demi volume de tampon phosphate pH 7,4 (Cl Na 0,15 M, Phosphates 0,05 M) et dialysé contre ce tampon jusqu'à élimination complète du sulfate d'ammonium. Les globulines ainsi obtenues ont été analysées par électrophorèse sur papier : elles contenaient essentiellement des γ mais aussi des β et des α globulines; aucune trace d'albumine n'était visible. *CARSTEN* et *EISEN* (1955) avaient utilisé la même technique de fractionnement et avaient observé la composition suivante des protéines obtenues : 63 % de γ globulines, 18 % de β globulines, 17 % d' α globulines et 2 % d'albumine.

L'absorption de cette solution à dilution convenable (1/75) en tampon phosphate est mesurée à 280 μ dans une cellule de 1 cm d'épaisseur. La densité optique de cette préparation est ensuite ramenée à 30 par addition d'un certain volume de tampon phosphate. Cette solution, répartie en plusieurs tubes, est conservée à -15° C. De la même manière ont été préparées des globulines de lapins non immunisés.

Ces solutions de globulines de densité optique 30 contiennent 3,73 mg d'azote par ml, soit 23,3 mg de protéines, en utilisant le facteur de conversion 6,25. Le poids moléculaire des γ globulines de lapin étant de 160 000, ces solutions de protéines sont $1,45 \cdot 10^{-4}$ molaires.



Planche I - Détail du dispositif de dialyse à l'équilibre.

IV - DIALYSE A L'EQUILIBRE

Technique.

Le dispositif que nous avons utilisé ne diffère de celui décrit par *KARUSH* et *EISEN*, que par un certain nombre de détails techniques. Ce dispositif symétrique consiste en l'assemblage de deux éléments identiques séparés par une membrane de dialyse (planche I). Les deux compartiments ont été préparés à partir de bouteilles en verre utilisées pour le conditionnement de la pénicilline. Ces bouteilles ont été coupées, grâce à un disque rotatif en carborundum, à la limite de leur partie cylindrique; seuls les fragments supérieurs ont été utilisés, après rodage de la surface de section. Les disques de membrane semi-perméable sont lavés à l'eau, rapidement essorés entre deux compresses et disposés entre les surfaces rodées de deux éléments. La cohésion de l'ensemble est assurée par une pince munie d'un fort ressort. L'étanchéité de ce joint est totale. L'orifice distal de chaque compartiment est fermé, après répartition des solutions, par un bouchon en caoutchouc. Pour éviter toute surpression dans le compartiment, une aiguille à injection est piquée à travers le bouchon au moment où celui-ci est mis en place. La capacité de chaque compartiment est d'environ 1,5 ml. La pince maintenant ce dispositif est ensuite fixée au pourtour d'une roue à axe horizontal tournant à la vitesse d'environ 3 tours/minute. Quarante systèmes analogues peuvent être fixés à cette roue (planche II).

Dans la plupart de nos expériences nous avons distribué dans un premier compartiment 0,60 ml (parfois 0,85 ml) d'une solution de globulines à analyser, de densité optique connue, 0,05 ml d'une solution radioactive d'haptène et 0,10 ml d'une solution non radioactive de ce même haptène ou d'un haptène différent (expériences d'inhibition) à diverses concentrations. Les mêmes volumes des mêmes solutions sont distribués dans le deuxième compartiment, mais les globulines proviennent d'un animal non immunisé. Toutes ces solutions sont faites en tampon phosphate (Cl Na 0,15 M, Phosphate 0,05 M, pH 7,4).

La plupart des déterminations d'équilibre ont été effectuées à + 6° C. La dialyse dans ce cas a été poursuivie quarante huit heures. A 25° C l'équilibre est plus rapidement atteint et vingt heures ont été suffisantes. En fait ces durées sont très supérieures au temps minimum nécessaire; l'équilibre est pratiquement atteint dès la dix-huitième heure à 6° C.



Planche II - Montage utilisé pour effectuer les dialyses à l'équilibre.

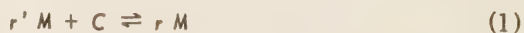
A la fin de cette expérience, le contenu de chaque compartiment est recueilli dans un tube et la radioactivité mesurée. Sur des disques de laiton de 23 mm de diamètre sont étalés puis évaporés à sec 0,1 ml ou 0,05 ml, selon que la densité optique de la solution de globuline est inférieure ou supérieure à 15, une quantité trop élevée de protéines entraînant une distribution irrégulière, variable du produit, lors du séchage. Les disques de laiton ont été au préalable chauffés rapidement dans la flamme d'un bec Bunsen pour dégraisser leur surface. Un tampon circulaire légèrement gras permet ensuite, par application, de rendre la périphérie du disque non mouillable. Le but de ces mesures étant de définir le rapport des activités dans les deux compartiments, et la concentration des globulines étant la même des deux côtés de la membrane, il n'est pas nécessaire de faire la correction que nécessiterait dans d'autres conditions l'auto absorption des rayons β de faible énergie.

Deux échantillons ont été ainsi préparés pour chaque compartiment et deux mesures effectuées pour chacun, sur un précompte de mille impulsions. La radioactivité initiale dans chaque compartiment était, sauf exception, de 80 à 150 ipm par 0,1 ml. Les mesures ont été faites avec un compteur automatique à membrane ultra fine et écoulement gazeux continu : son efficacité était, pour le carbone 14, de 33 %, son bruit de fond de 10. Dans ces conditions la précision de ces déterminations était supérieure à 3 %.

Analyse graphique des résultats.

Nous supposerons au cours des calculs suivants que tous les sites spécifiques des anticorps ont la même affinité pour l'haptène et que la liaison d'un site avec l'haptène ne modifie pas l'aptitude à réagir des autres sites présents sur la même molécule. Ces hypothèses n'ont d'autre justification que de simplifier l'analyse du phénomène. L'écart entre les prévisions théoriques et les faits observés traduira l'hétérogénéité éventuelle de la population d'anticorps.

La relation (1) rend compte de la réaction réversible de fixation de l'haptène au niveau des sites spécifiques :



Le symbole C représente la concentration d'haptène libre, M la concentration des anticorps, r le nombre moyen de sites liés à un hap-

tène par molécule d'anticorps et r' le nombre moyen de sites libres par molécule d'anticorps. Soit n le nombre de sites spécifiques par molécule d'anticorps, on a :

$$n = r + r' \quad (2)$$

et par conséquent à l'équilibre :

$$\frac{r' \cdot C}{r} = \frac{(n - r)}{r} C = K_D \quad (3)$$

ou

$$\frac{r}{(n - r) C} = K_A \quad (4)$$

selon que l'on considère la constante de dissociation K_D ou la constante d'association K_A .

L'analyse peut dès lors être conduite de la manière décrite par *SCATCHARD* (1949). Par transformation de l'équation (4) on obtient :

$$r/C = n \cdot K_A - r \cdot K_A \quad (5)$$

Si l'on porte les valeurs de r en abscisses et de r/C en ordonnées, on doit obtenir une droite de pente $-K_A$ coupant l'axe des abscisses pour une valeur de r égale à n . C'est cette analyse graphique des résultats qui a été utilisée par *KARUSH* et *EISEN* : l'intersection avec l'axe des abscisses a lieu pour une valeur égale à 2, mais la courbe obtenue n'est pas une droite, ce qui traduit l'hétérogénéité des sites quant à leur affinité pour l'haptène. Si la valeur de C est une donnée expérimentale immédiate - c'est la concentration d'haptène dans le compartiment où ne se trouvent pas les anticorps - les valeurs de r ne peuvent être calculées que si l'on connaît la quantité d'anticorps présents. La détermination graphique de K_A est indépendante de cette quantité d'anticorps puisque les valeurs portées en abscisses et en ordonnées sont inversement proportionnelles à cette quantité.

Les travaux de *KARUSH* ont été effectués avec des solutions pratiquement pures d'anticorps obtenus par élution d'un précipité spécifique à l'aide d'une solution concentrée d'haptène; la quantité d'anticorps

était ainsi exactement déterminée. La nécessité d'une purification préalable des anticorps présente l'inconvénient d'impliquer une sélection des anticorps : des anticorps de faible affinité peuvent ne pas précipiter (CARSTEN, EISEN et BELMAN); des anticorps d'affinité particulièrement élevée peuvent ne pas être élués du précipité spécifique. De fait 50 % seulement des anticorps initialement présents dans le sérum ont pu être obtenus en solution pure (KARUSH, 1956). Afin de pouvoir faire porter l'analyse directement sur l'ensemble des globulines, nous proposons une expression graphique n'impliquant pas une détermination indépendante de la quantité d'anticorps réagissants.

Une donnée expérimentale directe obtenue par dialyse à l'équilibre est le rapport R entre la concentration d'haptène dans le compartiment contenant les anticorps et la concentration d'haptène dans l'autre compartiment. La concentration dans le premier compartiment est égale à la somme de la concentration d'haptène libre C et de la concentration des haptènes liés aux anticorps : soit M la concentration molaire des anticorps, et r le nombre d'haptènes liés à chaque molécule d'anticorps, on a :

$$R = \frac{M \cdot r + C}{C} \quad (6)$$

En retranchant 1 à R on obtient une nouvelle valeur, ρ , qui est égale au rapport de la concentration d'haptène lié aux anticorps à la concentration d'haptène libre :

$$\rho = \frac{M \cdot r}{C} = R - 1 \quad (7)$$

Des équations (3) et (7) on tire la relation suivante :

$$C = nM (1/\rho) - K_D \quad (8)$$

C et $1/\rho$ sont des données expérimentales. Si l'on porte en abscisses les valeurs de $1/\rho$ et en ordonnées les valeurs de C , la courbe obtenue doit être une droite dont la pente est égale à la molarité des sites spécifiques (nM) et dont l'intersection avec l'axe des ordonnées définit la valeur de $-K_D$.

Cette analyse ne permet pas de définir n ou M , mais seulement la valeur du produit nM . En fait, la valeur de M se trouve ainsi déterminée sans ambiguïté. De nombreux travaux ont montré en effet que la valence des anticorps est égale à deux et ceci avec une excellente précision : qu'il s'agisse d'anticorps anti-protéine (SINGER et CAMPBELL, 1955) (MARRACK, HOCH et JOHNS, 1951) ou d'anticorps anti-haptènes (KARUSH, 1956) (EISEN et KARUSH, 1949). Ce dernier travail a trait à des anticorps anti-acide p-azo benzène arsonique, c'est-à-dire à des anticorps obtenus avec un haptène identique ou analogue à ceux que nous avons utilisés. L'intérêt du calcul de M réside seulement dans la comparaison qu'il permet d'établir avec les valeurs de M déterminées par les méthodes classiques : le produit nM a en effet en lui-même une signification simple : il exprime la concentration molaire des sites.

Très récemment, NISONOFF et PRESSMAN (1958) ont étudié graphiquement les résultats de dialyses à l'équilibre en portant en abscisses l'inverse de la concentration d'haptène libre et en ordonnées l'inverse de la concentration d'haptène lié aux anticorps. Cette analyse présente également l'avantage de ne pas nécessiter une détermination indépendante de la quantité d'anticorps et de caractériser l'hétérogénéité des anticorps à partir de données expérimentales immédiates. Cependant la pente des droites ou des courbes ainsi obtenues ne présente pas une signification simple. Selon la notation que nous avons employée, l'équation utilisée par ces auteurs s'écrirait :

$$(1/C \rho) = \frac{K_D}{nM} \frac{(1)}{(C)} + \frac{1}{nM}$$

Il suffit de multiplier les deux termes de cette équation par nMC pour retrouver l'équation (8). Exprimée avec les mêmes symboles, l'équation de SCATCHARD (5), après multiplication par $(K_D M/\rho)$, devient également identique à cette équation (8).

Supposons l'existence de deux solutions d'anticorps de même spécificité, mais de concentrations et de constantes d'affinité différentes. Chaque solution, par l'analyse graphique que nous proposons, sera caractérisée par une droite. Si par le même procédé nous analysons un mélange de ces deux solutions, on obtient une courbe, qu'il est d'ailleurs possible de construire à partir des deux droites précédemment obtenues. Inversement, l'obtention d'une courbe non rectiligne traduit l'hétérogénéité des anticorps analysés.

La plupart des analyses que nous rapportons ont été réalisées pour des concentrations d'haptène libre variant entre $3 \cdot 10^{-8}$ M et $4 \cdot 10^{-6}$ M. Pour des concentrations plus élevées nous n'avons plus généralement observé de déplacement d'équilibre. Les valeurs de ρ ont varié dans nos

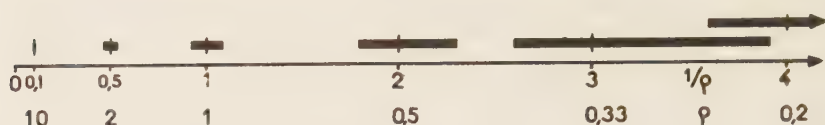


Figure 7.- Limites d'erreurs dans la détermination de diverses valeurs du rapport $1/\rho$.

expériences de zéro à environ 20. Les valeurs de $1/\rho$ varient donc entre 0,05 et l'infini. Sur la figure 7 sont portées les limites des erreurs qu'il est possible de faire dans la détermination de $1/\rho$. Ces erreurs, faibles pour les valeurs de $1/\rho$ inférieures à 1 ou même à 2, deviennent ensuite très importantes. Nous n'avons pas prolongé l'axe des abscisses au delà de 4, qui correspond à un rapport de concentrations, des deux côtés de la membrane, égal à 1,25. Au delà, la précision de la détermination est trop incertaine, bien que des valeurs de R de 1,10 traduisent encore la présence d'anticorps de façon significative.

Etudes par la méthode d'inhibition.

L'analyse que nous venons de développer s'applique au cas où l'équilibre est déterminé en présence de différentes concentrations d'un même haptène. Dans un certain nombre d'expériences nous avons ajouté à une quantité fixe, juste mesurable, d'un haptène radioactif, des quantités croissantes d'autres haptènes de structure voisine, et nous avons mesuré le rapport des concentrations de l'haptène radioactif dans les deux compartiments, à l'équilibre. Cette technique nous a permis d'obtenir des renseignements sur l'affinité présentée par des haptènes dont nous ne possédions pas d'échantillons radioactifs. Elle permet également de mettre en évidence l'existence d'affinités extrêmement faibles qui n'entraîneraient aucun déplacement d'équilibre par une mesure directe, même pour un haptène radioactif.

Cette technique d'inhibition enfin, telle que nous venons de la décrire, permet de faire porter électivement l'analyse sur les anticorps qui ont pour l'haptène radioactif choisi l'affinité la plus élevée. Nous verrons quel parti il nous a été possible de tirer de ce fait.

Nous rapportons nos résultats graphiquement en portant en ordonnées les valeurs du rapport ρ et en abscisses, selon une échelle logarithmique, les valeurs des concentrations d'haptènes libres à l'équilibre. Lorsque l'haptène non radioactif ajouté est différent de l'haptène radioactif, il ne nous est pas possible expérimentalement de mesurer la concentration d'inhibiteur libre, mais seulement de fixer une valeur maximum et une valeur minimum. La limite supérieure est la concentration présente au temps zéro. Il est nécessaire d'effectuer une détermination indépendante pour fixer la limite inférieure : c'est la concentration d'haptène libre mesurée lorsque l'haptène précédemment utilisé comme inhibiteur est ajouté seul, à la même concentration. Cette mesure implique que nous disposions d'un échantillon radioactif de cet haptène. Si tel n'est pas le cas, la concentration de l'inhibiteur libre est nécessairement supérieure à celle qui a été déterminée pour une même concentration initiale de l'haptène homologue. Ces limites supérieures et inférieures sont portées sur nos graphiques. Cet intervalle ne traduit donc pas les limites d'erreurs. La précision des déterminations ainsi effectuées est suffisante pour permettre de situer sans ambiguïté les différentes courbes obtenues les unes par rapport aux autres.

Si la concentration d'haptène radioactif était infiniment faible, la concentration d'inhibiteur, pour laquelle le rapport ρ atteint la moitié de sa valeur maximum, définirait la valeur de la constante de dissociation de cet inhibiteur. Cette valeur correspond en effet à la saturation de la moitié des sites par l'inhibiteur.

Tel est pratiquement le cas lorsque l'haptène radioactif est l'acide sulfanilique puisque les concentrations utilisées sont environ cent fois inférieures à la concentration de demi-saturation (K_D). Dans le cas des azotyrosines radioactives, cet écart n'est que de deux à quatre fois et par conséquent il devient nécessaire d'appliquer une formule de correction. Il n'est pas indispensable pour la discussion de nos résultats de développer ici ces calculs.

V - RESULTATS

Afin de tenir compte de la variabilité, d'un individu à un autre, des propriétés spécifiques des anticorps, nous avons utilisé pour chaque série de mesures des globulines provenant d'un même individu, à l'exclusion de mélanges de globulines provenant de plusieurs animaux. La technique de dialyse à l'équilibre nécessitant des quantités relativement

élevées d'anticorps, nous n'avons pu de ce fait effectuer un nombre élevé de déterminations sur chaque préparation de globulines. Cependant les résultats obtenus par l'analyse des globulines de divers animaux immunisés uniquement soit avec AHpS, soit avec AHmS, ont permis de préciser certaines propriétés communes à toutes les populations d'anticorps obtenues à la suite d'immunisations identiques.

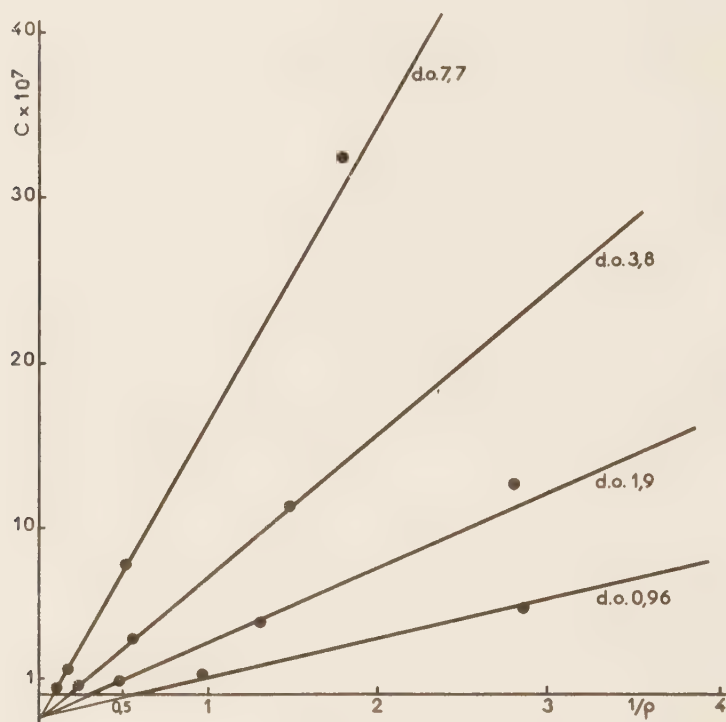


Figure 8 - Analyse des globulines du lapin A 405 (première et deuxième injections AHpS) - Densités optiques : 7,7; 3,8; 1,9; 0,96 - Pente des droites obtenues : 17,1; 8,1; 4,1; 2,1 - Valeur de K_D ($^\circ C$) : $1,1 \cdot 10^{-7}$ - Haptène : TpS.

Rappelons le principe de l'analyse graphique proposée. Nous avons déterminé à plusieurs concentrations d'haptène libre (C) le rapport ($1/\rho$) de la concentration d'haptène libre à la concentration d'haptène combiné aux anticorps, dans les conditions d'équilibre. Si l'on porte en abscisses les valeurs de $1/\rho$ et en ordonnées les valeurs de C , on doit obtenir,

si l'équation (8) est valable, une droite dont la pente est égale à la molarité des sites (nM) et dont l'intersection avec l'axe des ordonnées définit la constante de dissociation K_D .

$$C = nM (1/\rho) - K_D \quad (8)$$

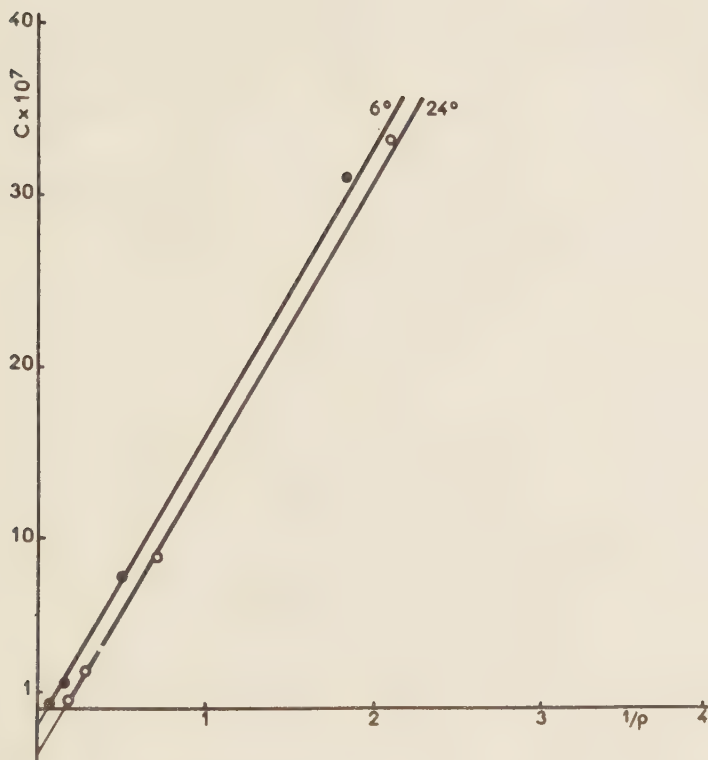


Figure 9 - Analyse des globulines du lapin A 405 (première et deuxième injections AHpS) - Densité optique : 7,7 - Pente des droites : 16,5 - A 6° C, $K_D = 10^{-7}$ - A 24° C, $K_D = 2,5 \cdot 10^{-7}$ - Haptène : TpS.

Les premiers résultats que nous rapportons (figures 8 et 9), confirment la validité de la méthode d'analyse graphique que nous avons proposée. Ces deux séries de mesures ont été effectuées avec des

globulines provenant d'un animal immunisé avec AHpS. L'haptène utilisé était l'haptène homologue ^{14}C TpS.

La figure 8 montre que, si l'on effectue cette analyse sur différentes dilutions d'une même préparation de globulines, les points expérimentaux permettent de tracer une série de droites dont les pentes sont proportionnelles aux concentrations des solutions analysées et qui coupent l'axe des ordonnées en un même point caractéristique de la constante de dissociation des anticorps en cause.

Inversement, la figure 9 indique les résultats obtenus pour une même solution de globulines lorsque les dialyses à l'équilibre sont effectuées à deux températures différentes : dans ce cas, la quantité d'anticorps reste la même, mais la constante de dissociation est différente. Nos résultats permettent de définir deux droites parallèles.

Le tableau suivant donne les valeurs des variations d'énergie libre, d'enthalpie et d'entropie qu'il est possible de déterminer à partir des valeurs de K_D obtenues à deux températures différentes.

TABLEAU VI

	à 24° C	à 6° C
$K_D \cdot 10^7$ (mole/litre)	2,5	1
$K_A \cdot 10^{-6}$ (litre/mole)	10	4
$-\Delta F_0$ (kcal./mole)	8,97	8,94
$-\Delta H_0$ (kcal./mole)	8,39	
$-\Delta S_0$ (cal./mole, degré)	2	

Il apparaît donc clairement des figures 8 et 9, que la pente des droites obtenues est proportionnelle à la concentration des anticorps présents et que l'intersection de ces droites avec l'axe des ordonnées est déterminée indépendamment de la concentration, par la constante de dissociation des anticorps. Le fait que les points expérimentaux se disposent selon des droites est conforme à l'hypothèse de l'homogénéité des sites que nous avons faite pour simplifier l'analyse du phénomène. Nous aurons l'occasion de discuter des limites de validité de cet accord apparent entre nos résultats et l'hypothèse de l'homogénéité des anticorps.

Il nous est possible d'effectuer ce type d'analyse avec tous les haptènes dont nous possédons des échantillons radioactifs, c'est-à-dire avec TpS, TmS, TpAs et l'acide sulfanilique. Nous avons étudié l'affinité pour chacun de ces quatre haptènes des globulines d'animaux immunisés uniquement avec AHpAs, AHpS ou AHmS.

Les globulines spécifiques de AHpAs ne concentrent pas de façon détectable les haptènes porteurs de radicaux sulfoniques; inversement, les globulines spécifiques de AHpS ou de AHmS ne concentrent pas TpAs même pour les plus faibles concentrations d'haptène que nous puissions utiliser. Des résultats obtenus avec les globulines spécifiques de AHpS ou de AHmS et les haptènes porteurs d'un radical sulfonique,

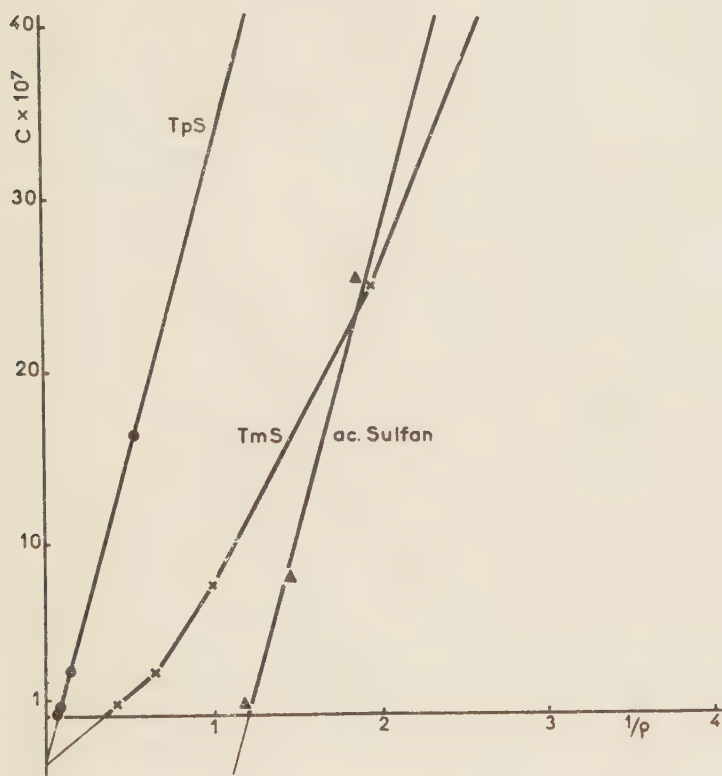


Figure 10 - Analyse des globulines du lapin A 406 (première et deuxième injections AHpS) - Densité optique : 10 - Haptènes : TpS ($nM = 3,5 \cdot 10^{-6}$, $K_D = 2,4 \cdot 10^{-7}$) - Acide sulfanilique ($K_D = 4,5 \cdot 10^{-6}$) - TmS (courbe à concavité supérieure) - TpAs ($\rho = 0$, même pour $C = 10^{-7}$ M).

sont présentés dans les figures 10 et 11. La constatation essentielle est que, pour les globulines spécifiques de AHpS (figure 10), les points expérimentaux se répartissent sur une droite pour l'acide sulfanilique libre ou conjugué par diazotation à la tyrosine, mais sur une courbe à concavité supérieure pour TmS. La situation est symétrique pour les globulines spécifiques de AHmS (figure 11). On obtient une droite pour l'azotyrosine homologue TmS, une courbe à concavité supérieure pour TpS.

Les droites obtenues dans l'analyse des globulines et de l'azotyrosine homologue permettent de définir pour ces systèmes la valeur

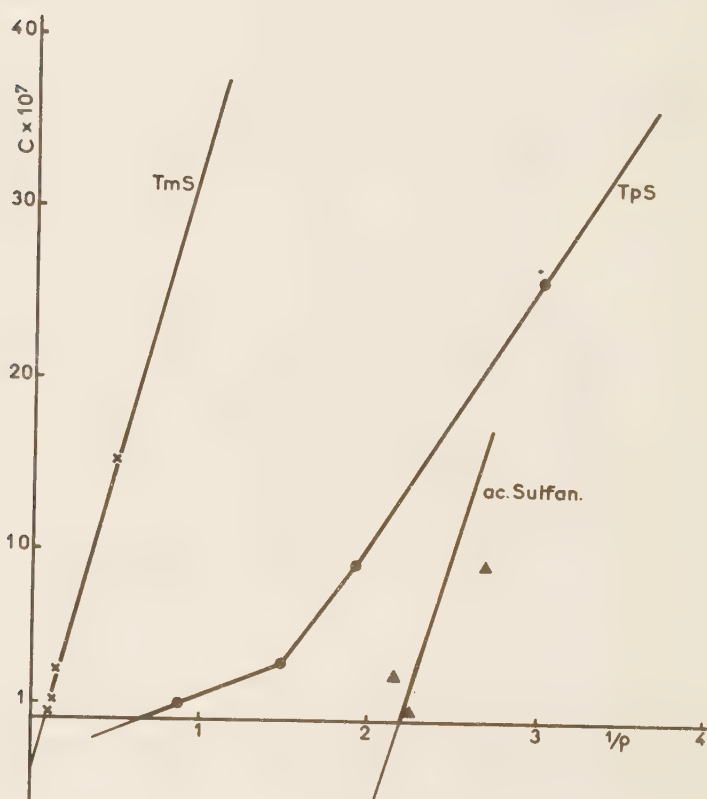


Figure 11 - Analyse des globulines du lapin A 438 (première et deuxième injections AHmS) - Densité optique : 10 - Haptènes : TmS ($nM = 3,9 \cdot 10^{-6}$, $K_D = 2,8 \cdot 10^{-7}$) - Acide sulfanilique ($K_D = 7 \cdot 10^{-6}$) - TpS (courbe à concavité supérieure) - TpAs ($\rho = 0$ même pour $C = 10^{-7}$ M).

de la constante de dissociation. Pour l'ensemble de nos expériences, ces valeurs ont toujours été comprises entre 10^{-7} et 3.10^{-7} .

La courbe à concavité supérieure obtenue avec l'azotyrosine hétérologue traduit une hétérogénéité considérable des sites spécifiques quant à leur affinité pour ces composés. L'infléchissement marqué observé dans tous les cas pour les concentrations faibles d'haptène libre révèle l'existence en quantité relativement faible d'anticorps ayant pour cet haptène une constante de dissociation peu différente de celle déterminée pour l'azotyrosine homologue. La pente de la courbe expérimentale augmente pour des concentrations plus élevées d'haptène libre, ce qui traduit l'existence, en quantité relativement importante, d'anticorps ayant pour l'haptène hétérologue une affinité plus faible. La courbe obtenue doit être considérée comme la résultante de deux ou plusieurs droites, dont chacune correspond à un groupe d'anticorps caractérisé par une certaine valeur de nM et de K_D . On peut envisager aussi l'existence d'une population d'anticorps dont les affinités variaient de façon pratiquement continue.

Du fait que l'acide sulfanilique est concentré par les anticorps beaucoup moins efficacement que l'azotyrosine homologue, les valeurs du rapport $1/\rho$ ne peuvent être déterminées avec précision dans les conditions de nos expériences (voir figure 7 les limites d'erreurs possibles en fonction de la valeur de ce rapport). Une série d'essais a été effectuée en utilisant des concentrations croissantes des seuls échantillons radioactifs d'acide sulfanilique ou de ^{35}S TpS. La radioactivité mesurée dans ces conditions était directement proportionnelle aux concentrations de chacun de ces haptènes et, pour les concentrations élevées, la forte radioactivité des échantillons permettait une détermination assez précise du rapport ρ même lorsque sa valeur était très faible. Nous avons observé que les points expérimentaux définis pour l'acide sulfanilique se situaient avec une bonne approximation sur une droite qui était pratiquement parallèle à la droite définie pour l'azotyrosine homologue. Dans la plupart de nos analyses les points, souvent peu nombreux, obtenus pour l'acide sulfanilique ne nous permettent certainement pas de définir les courbes relatives à cet haptène, mais seulement de les situer par rapport aux courbes obtenues pour les azotyrosines. Les valeurs de la constante de dissociation qu'il a été possible d'apprécier sont de l'ordre de 3 à 7.10^{-6} .

Dans les figures 10 et 11, les déterminations effectuées pour l'azotyrosine homologue correspondent à des concentrations d'haptène libre variant de $0,2$ à 16.10^{-7} M. Lorsque des concentrations plus élevées d'azotyrosine homologue, comprises entre 20 et 40.10^{-7} M, sont utilisées, les points expérimentaux obtenus sont en règle générale décalés

vers la gauche par rapport à la droite définie aux faibles concentrations (figures 8, 9, 16 et 18). Des mesures effectuées pour des concentrations d'haptène supérieures à 40.10^{-7} M ont confirmé cette incurvation, mais les valeurs de $1/\rho$ sont alors élevées et déterminées de ce fait de façon assez imprécise. Cette analyse révèle donc une certaine hétérogénéité des anticorps vis-à-vis de l'azotyrosine homologue.

Les courbes en traits pleins de la figure 16 (page 99) ont été obtenues à la suite d'un rappel homologue, c'est-à-dire dans les mêmes conditions d'immunisation que les globulines étudiées dans ce chapitre. Il n'est pas possible de déterminer la valeur de la constante de dissociation pour l'azotyrosine hétérologue à partir des trois points expérimentaux indiqués. Ces données sont compatibles cependant avec l'existence d'une très faible fraction d'anticorps ayant pour cet haptène une affinité voisine de celle observée pour l'azotyrosine homologue et très supérieure à celle manifestée pour l'acide sulfanilique. Quoi qu'il en soit, l'azotyrosine hétérologue est, dans ce cas, concentrée moins efficacement que l'acide sulfanilique, alors que la situation inverse est observée dans les figures 10 et 11, pour les mêmes concentrations d'haptène libre. Il est important pour la suite de nos expériences d'insister sur cette grande variabilité, d'un individu à un autre, des propriétés manifestées par les populations d'anticorps vis-à-vis de l'haptène hétérologue.

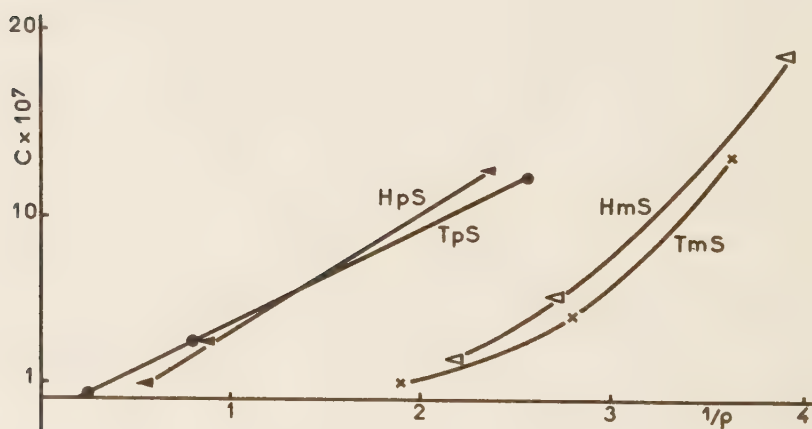


Figure 12 - Analyse des globulines du lapin A 461 (première et deuxième injections AHpS) - Densité optique : 10 - Haptènes : TpS, HpS, TmS et HmS.

Analyses effectuées avec les azohistidines - La figure 12 représente les résultats obtenus par l'analyse des globulines anti AHpS par les azohistidines et les azotyrosines. Le parallélisme dans le comportement de ces deux séries de produits est extrêmement net. Le problème posé est de savoir si ce sont les mêmes anticorps qui présentent une affinité élevée pour les deux azocomposés homologues ou si chacun de ces motifs, existant au niveau de l'antigène injecté, a suscité la formation d'anticorps différents, spécifiquement adaptés à chacune de ces configurations. Ce problème sera envisagé entre autres au cours de nos études par la méthode d'inhibition que nous rapportons maintenant.

Etude par la méthode d'inhibition.

Nous avons étudié par dialyse à l'équilibre l'inhibition de la fixation d'un haptène radioactif, présent en quantité très faible, par addition de quantités croissantes de diverses molécules non radioactives de structure voisine. Cet abord expérimental nous était indispensable pour obtenir une détermination de l'affinité des anticorps pour l'acide méthanilique ou l'acide arsanilique et, en général, pour tous les haptènes dont nous ne possédions pas d'échantillons radioactifs. Mais d'autres problèmes ont été également étudiés par cette technique.

La figure 13 résume une série de mesures. On voit tout d'abord que les molécules qui ne présentent pas de radicaux sulfoniques sont dépourvues de tout effet inhibiteur sur la fixation de l'azotyrosine homologue (TpS) : c'est le cas de l'acide arsanilique et de la tyrosine couplée à l'aniline. Seule la molécule de TpAs commence à manifester un effet inhibiteur lorsque sa concentration devient environ cinquante mille fois supérieure à la concentration de ^{35}S TpS. La spécificité est donc déterminée essentiellement par la nature du radical acide de l'haptène. On constate également sur ce graphique que pour des concentrations suffisamment élevées de TmS, l'haptène homologue est déplacé de tous les sites auxquels il s'était combiné. Ces résultats suggèrent que l'inhibition par l'acide sulfanilique ou méthanilique aurait pu être totale si des concentrations plus élevées de ces acides avaient pu être utilisées.

La constatation essentielle qu'appelle l'examen de la figure 13 est que l'acide sulfanilique et l'acide méthanilique entrent en compétition avec l'azotyrosine homologue avec une efficacité sinon égale du moins très voisine. Le groupement aminé de ces acides, qui n'existe pas sous cette forme dans le motif antigénique, joue un rôle mineur dans la

combinaison de ces acides avec l'anticorps. Par contre, lorsque ces acides arylaminés sont couplés par diazotation à des protéines ou à la tyrosine, la position de leur radical aminé revêt une importance critique

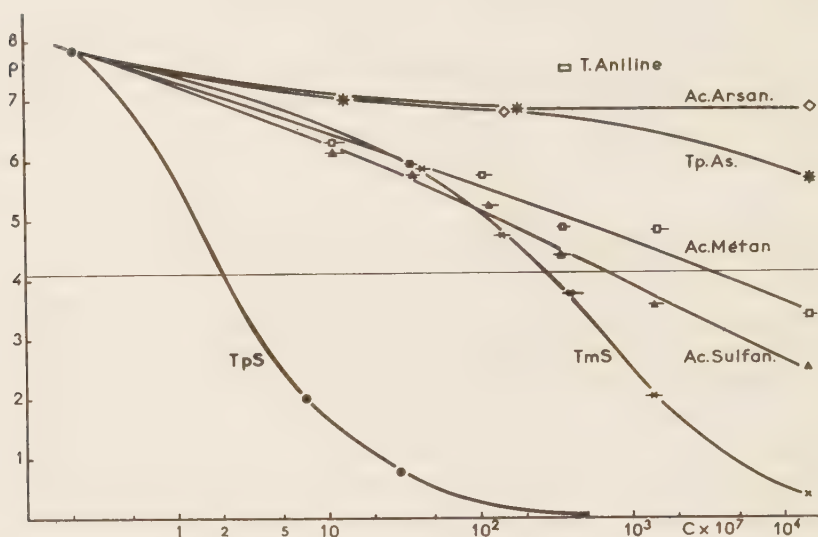


Figure 13 - Analyse des globulines du lapin A 466 (première et deuxième injections AHpS) - Densité optique : 10 - Technique d'inhibition - Haptène radioactif ^{35}S TpS - Haptènes non radioactifs : TpS, TmS, TpAs, T aniline et les acides sulfanilique, métanilique et arsanilique. Pour la tyrosine couplée par diazotation à l'aniline, nous n'avons pu utiliser dans cette expérience de concentrations finales supérieures à $4 \cdot 10^{-5}$ M, par suite de la faible solubilité du produit.

puisque c'est elle qui conditionne la configuration spatiale du motif antigénique ou de l'haptène ainsi synthétisé : les résultats rapportés dans la figure 13 opposent nettement la proximité des courbes obtenues avec l'acide sulfanilique ou l'acide métanilique à l'éloignement des courbes obtenues avec TpS ou TmS.

La figure 14 enfin, montre que l'azohistidine homologue est également chassée des sites spécifiques qu'elle occupe par des concentrations croissantes de divers haptènes porteurs de radicaux sulfoniques. On voit qu'il existe, dans des globulines anti AHpS, des anticorps qui

sont mieux adaptés à HpS qu'à TpS et qui doivent être considérés comme formés en réponse au motif azohistidyl. Ces anticorps sont susceptibles de se combiner, par ordre d'affinité décroissante, avec HpS, TpS, TmS et l'acide sulfanilique.

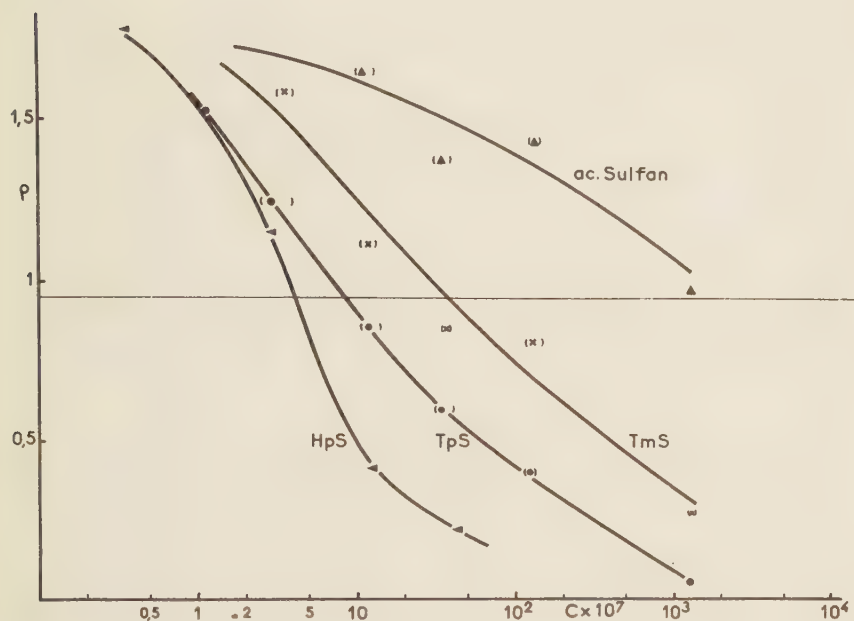


Figure 14 - Analyse des globulines du lapin A 461 (première et deuxième injections AHpS) densité optique = 10 - Technique d'inhibition - Haptène radioactif ^{14}C HpS - Haptènes non radioactifs : HpS, TpS, TmS, Acide sulfanilique.

Dans ces expériences d'inhibition, nous avons utilisé des concentrations d'haptènes radioactifs extrêmement faibles. A ces concentrations, en l'absence d'inhibiteur, le rapport ρ atteint pratiquement sa valeur maximum et la fraction des sites des anticorps qui se trouvent à un instant donné en liaison avec l'haptène est faible. S'il existe une population de sites caractérisés par des affinités différentes pour cet haptène, ce seront naturellement les sites à forte affinité qui seront

ainsi engagés préférentiellement dans cette liaison. Lorsque l'haptène radioactif est l'azotyrosine homologue ou l'acide sulfanilique, l'analyse par la technique d'inhibition porte sinon sur l'ensemble de la population d'anticorps, tout au moins sur les anticorps du groupe relativement homogène vis-à-vis des haptènes homologues. Il n'est pas exclu toutefois que si la concentration de l'haptène radioactif avait été plus élevée, les résultats eussent pu être différents. *

La possibilité de faire porter l'analyse, par l'emploi de quantités très faibles d'haptènes radioactifs, sur une partie seulement des sites spécifiques, peut être mise à profit dans l'étude de la réaction croisée.

Nous avons vu, en effet, que les anticorps se révèlent hétérogènes vis-à-vis de l'azotyrosine hétérologue et qu'une partie d'entre eux présente pour cet haptène une affinité du même ordre que celle définie vis-à-vis de l'azotyrosine homologue. Mais la détermination de la valeur minimum de K_D , par l'intersection de l'axe des ordonnées avec le prolongement de la courbe expérimentale, ne pouvait être précise. Nous avons donc repris ce problème par la méthode d'inhibition. Des globulines anti AHpS ont été mises au contact de ^{14}C TmS à concentrations très faibles, juste mesurables, et la fixation de cet haptène aux anticorps a été étudiée en présence de concentrations croissantes de TmS ou de TpS non radioactifs. L'expérience a montré que l'haptène homologue TpS est plus efficace que TmS pour déplacer ^{14}C TmS des sites spécifiques qui présentaient cependant pour l'azotyrosine hétérologue l'affinité maximum. Des observations symétriques ont été faites dans l'analyse des globulines anti AHmS par ^{14}C TpS et des concentrations croissantes des deux azotyrosines non radioactives. Les résultats sont présentés dans les deux graphiques supérieurs de la figure 19 (chapitre IV).

Ainsi, même ceux des anticorps qui ont l'affinité la plus élevée pour l'azotyrosine hétérologue ont une configuration structurale mieux adaptée à l'azotyrosine homologue.

Nous reviendrons sur la signification théorique de ce fait. Remarquons seulement que si les résultats obtenus avaient été différents, il eut été difficile d'écarter l'éventualité d'une contamination réciproque de l'acide sulfanilique et de l'acide métanilique utilisés pour la synthèse des antigènes azoïques.

* Afin de déterminer une valeur moyenne de la constante d'association, par la méthode d'inhibition, KARUSH (1956) utilisait des concentrations de colorant et d'inhibiteur telles que les quantités de ces deux substances liées aux anticorps soient du même ordre.

VI - DISCUSSION DES RESULTATS

Les résultats exposés dans ce chapitre montrent que la méthode de dialyse à l'équilibre combinée à celle des traceurs radioactifs permet de mettre en évidence, dans les immunsérums, des populations d'anticorps présentant pour l'haptène homologue une haute affinité ainsi qu'une relative homogénéité, alors que la même population moléculaire présente vis-à-vis d'haptènes hétérologues une hétérogénéité très marquée.

Le problème de l'hétérogénéité des populations d'anticorps ne nous intéresse pas seulement du point de vue méthodologique mais aussi en ce qu'il est lié à l'interprétation même des mécanismes de synthèse. Nous allons donc discuter nos résultats en les situant par rapport aux principaux faits acquis dans ce domaine. Une question doit tout particulièrement retenir notre attention : l'hétérogénéité des populations d'anticorps est-elle «essentielle», c'est-à-dire inhérente au mécanisme de la synthèse lui-même ou bien «résultante», c'est-à-dire due à l'hétérogénéité du matériel immunogène ?

1°) Degré d'hétérogénéité des anticorps vis-à-vis de l'haptène homologue.

L'emploi d'haptènes libres pour l'étude de l'hétérogénéité des populations d'anticorps présente un intérêt évident puisque dans ce cas la nature, le nombre et les relations spatiales des groupements qui peuvent être intéressés par les liaisons sont parfaitement connus. La première étude quantitative de l'hétérogénéité des anticorps anti haptènes vis-à-vis de l'haptène homologue a été effectuée par *PAULING*, *PRESSMAN* et *GROSSBERG* (1944). Leur technique consistait à mesurer quantitativement l'inhibition de la précipitation du système antisérum-antigène homologue par des quantités croissantes d'haptène. Aux très faibles concentrations d'haptène, les anticorps se sont révélés homogènes. Pour des concentrations plus élevées d'haptène, ces auteurs ont montré que les déterminations effectuées étaient compatibles avec l'existence d'une population d'anticorps dont l'hétérogénéité serait décrite par une fonction d'erreur dans l'énergie libre de combinaison de l'haptène avec l'anticorps. Les résultats de *EISEN* et *KARUSH* (1949), de *KARUSH* (1956), de *NISONOFF* et *PRESSMAN* (1958), obtenus par la méthode de dialyse à l'équilibre peuvent être également interprétés de cette façon.

Nos propres expériences ont montré qu'aux très faibles concentrations d'haptène homologue que nous avons pu utiliser ($0,3$ à $20 \cdot 10^{-7}$ M) les anticorps ont paru homogènes dans les limites des erreurs expérimentales. Cependant, pour des concentrations plus élevées d'haptène libre, on note les premiers signes d'hétérogénéité.

Dans la méthode de dialyse à l'équilibre, il est clair que les anticorps de haute affinité masquent les anticorps d'affinité faible. Pour une concentration donnée d'haptène libre, la fraction des anticorps combinés à l'haptène est de 50 % si les anticorps ont pour cet haptène une constante de dissociation égale à cette concentration. Cette fraction est égale à 91 % si la constante de dissociation est dix fois plus faible et à 9 % si la constante de dissociation est dix fois plus élevée. L'analyse effectuée à des concentrations d'haptène très faibles porte donc essentiellement sur les anticorps de haute affinité. Or la valeur de la constante de dissociation que nous avons déterminée pour les systèmes anticorps-azotyrosine homologue est de 1 à $3 \cdot 10^{-7}$. C'est la valeur la plus faible qui ait été jusque la mesurée pour un système haptène anti haptène. C'était également la première fois que les mesures étaient effectuées jusqu'à des concentrations minimum d'haptène libre de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} M.

La valeur de la constante de dissociation dépend-elle des concentrations d'haptènes auxquelles elle a été déterminée ? *TALMAGE* (1957) a émis cette hypothèse après avoir remarqué que les valeurs déterminées pour K_D par différents auteurs, bien que variant dans le rapport de 1 à 10 000, sont peu différentes des plus faibles valeurs des concentrations d'haptène ou d'antigène utilisées dans chacune de ces déterminations. Pour tenter d'expliquer cette remarquable coïncidence, *TALMAGE* suppose l'existence d'un spectre continu d'affinités, la fréquence relative de chaque type de site étant d'autant plus élevée que son affinité pour l'antigène est plus faible. A une extrémité de ce spectre se trouveraient, en grande quantité, des globulines que leur très faible affinité pour l'antigène ne permettrait pas de distinguer des globulines normales; à l'autre extrémité du spectre, des globulines d'affinité très élevée présentes en quantité très faible. Cette notion d'un spectre continu d'affinités - qui est un des traits caractéristiques de la théorie de *JERNE* - a été d'abord suggérée par cet auteur en 1952. *PAULING* (1954) a également montré qu'une telle distribution était une conséquence logique de sa théorie antérieurement formulée sur la formation des anticorps.

Cette conception séduisante n'est appuyée que sur six observations seulement, rassemblées par *TALMAGE* (1957 p. 236). Les valeurs extrêmes de la constante de dissociation ont été obtenues par *SINGER* et

CAMPBELL (1955) d'une part et par *FARR* (1956-1957) d'autre part, pour un même antigène, l'albumine bovine, la constante de dissociation étant dans ce cas déterminée par une technique originale décrite par ces auteurs. Le principe de cette méthode est de séparer l'antigène libre de l'antigène engagé dans des complexes solubles avec les anticorps, par précipitation en présence d'une concentration convenable de sulfate d'ammonium. Pour des concentrations d'antigène variant de 30 à $120 \cdot 10^{-5}$ M (*SINGER* et *CAMPBELL*) et de 6 à $60 \cdot 10^{-8}$ M (*FARR*) les constantes de dissociation ont été respectivement de $4 \cdot 10^{-5}$ et de 0,6 à $60 \cdot 10^{-8}$. Pour les anticorps anti haptènes (*EISEN* et *KARUSH*, 1949, *CARSTEN* et *EISEN*, 1955) les valeurs de K_D sont beaucoup plus groupées, entre 3 et $30 \cdot 10^{-6}$, mais les concentrations d'haptènes ne varient de leur côté qu'entre 5 et $100 \cdot 10^{-6}$ M, des concentrations plus faibles de ces haptènes, pourtant fortement colorés, n'étant pas mesurables par spectrophotométrie.

Nos propres observations viennent appuyer l'hypothèse de *TALMAGE* en montrant que pour les haptènes aussi bien que pour les protéines, l'utilisation de concentrations extrêmement faibles entraîne la détermination, pour la constante de dissociation, de valeurs également faibles. La plupart de nos mesures ont été effectuées pour des concentrations d'haptènes variant de 0,3 à $30 \cdot 10^{-7}$ M, les valeurs de K_D ont été de 1 à $3 \cdot 10^{-7}$.

Ces différents résultats concordent en ce qu'ils permettent d'envisager une relation entre les concentrations d'haptène utilisées et les constantes de dissociation déterminées. Mais ces observations sont en fait très peu nombreuses et, surtout, ont été effectuées dans des conditions expérimentales très différentes. Signalons par exemple que nos expériences ne diffèrent pas seulement des expériences de *EISEN* et de *KARUSH* par les concentrations d'haptène utilisées mais aussi par la nature de l'haptène et le mode d'immunisation des animaux. Il serait nécessaire qu'une étude systématique soit faite avec un système unique. Nous avons vu, au cours de la description de nos expériences, que la droite déterminée pour l'haptène homologue s'incurvait aux concentrations élevées d'haptène : si la constante de dissociation avait été déterminée pour des concentrations d'haptènes comprises entre 10^{-6} et 10^{-4} M, les valeurs trouvées auraient donc été sensiblement supérieures à 10^{-7} . Mais dans les conditions de nos expériences les valeurs de ρ sont alors si faibles qu'aucune détermination précise ne peut être atteinte. Il faudrait parallèlement utiliser des concentrations beaucoup plus élevées d'anticorps, ce qui nécessiterait l'emploi non plus de l'ensemble des globulines d'un immunosérum, mais d'anticorps

purifiés (comme dans les expériences de *KARUSH*, d'*EISEN* et de *NISONOFF* et *PRESSMAN*). Dans quelle mesure cette purification, nécessairement réalisée au moyen d'agents spécifiques, n'implique-t-elle pas une sélection des anticorps ? Le problème de l'hétérogénéité, ainsi posé, est d'un abord expérimental ardu.

Ce qui caractériserait une distribution conforme à l'hypothèse de *TALMAGE* serait l'existence d'une relation entre l'affinité d'un anticorps donné et sa quantité relative dans la population. Les différentes observations rapportées au cours de cette discussion ne laissent guère de doute sur le fait que les populations d'anticorps sont hétérogènes, mais les données que nous possédons ne permettent pas de dire si une relation, du type envisagé par *TALMAGE*, existe ou non.

En revanche, il faut insister sur le fait que l'emploi d'un haptène unique ne peut en aucune façon garantir l'homogénéité du matériel immunogène et que, par conséquent, l'hétérogénéité observée peut, pour une part tout au moins, refléter l'hétérogénéité des motifs antigéniques eux-mêmes.

En effet, même lorsqu'on utilise un haptène unique, on doit tenir compte de ce que la diazotation fixe cet haptène en des points variés de la molécule de protéine. La fixation s'effectue à la place d'un seul ou des deux hydrogènes mobiles des radicaux tyrosyl ou histidyl, et probablement en d'autres points puisque l'on peut fixer par diazotation un nombre de groupements hapténiques bien plus élevé que celui correspondant à la saturation de tous les radicaux tyrosyl et histidyl (*BOYD* et *HOOKER*, 1934). Ces acides aminés de plus sont liés dans les chaînes peptidiques à différentes séquences. De très nombreux motifs antigéniques sont ainsi constitués. Or *PAULING*, *PRESSMAN* et *GROSSBERG* (1944) ont montré que la réactivité des anticorps pour une même partie du motif hapténique est conditionnée par l'ensemble du motif antigénique dans lequel il est inclus : selon que les anticorps étaient obtenus en réponse à une protéine azo-p-phényl arsonique ou à une même protéine azo-p-(p-aminophényl azo) phényl arsonique, ils réagissaient de façon qualitativement différente avec l'acide arsanilique, les anticorps du premier type lui étant plus étroitement adaptés.

En fait la notion même d'un motif immunogène unique et stable *in vivo* est difficile à concevoir. Les substances étrangères peuvent, à différents stades de leur dégradation non spécifique, et donc sous différentes formes, exercer leur action antigénique, quel qu'en soit le mécanisme supposé. L'interaction des antigènes avec les anticorps,

présents en cours d'immunisation, peut également entraîner des altérations de motifs. Enfin un motif structural donné peut susciter la formation de sites spécifiques différents par leurs dimensions.

Il apparaît donc que l'hétérogénéité des anticorps vis-à-vis de l'haptène homologue pourrait être due, dans une large mesure tout au moins, à la nature même du matériel expérimental. Cependant comme nous l'avons vu, l'emploi d'haptènes hétérologues révèle dans la population d'anticorps une hétérogénéité très marquée qui semble être de nature «essentielle».

2°) - Réaction croisée.

En 1936, *LANDSTEINER* et *VAN DER SCHEER* ont montré que les antisérums spécifiques d'une azoprotéine donnée ne contiennent pas un seul type d'anticorps anti haptènes, mais des groupes distincts d'anticorps dont la réactivité vis-à-vis de divers haptènes de structure voisine est différente, bien que toujours inférieure à la réactivité vis-à-vis de l'haptène homologue. Une fraction différente des anticorps intervient préférentiellement dans chacune des réactions croisées envisagées et l'intensité de ces réactions croisées varie d'un individu à un autre. Cependant tous les anticorps peuvent réagir avec l'un quelconque de ces haptènes hétérologues puisqu'il est possible d'obtenir une inhibition complète de la réaction homologue en présence d'une concentration suffisamment élevée des haptènes hétérologues. La précision de ces conclusions est admirable. Ainsi pourrait-on, aujourd'hui encore, résumer nos connaissances sur la réaction croisée. Est-il besoin de rappeler que l'analyse effectuée par ces auteurs était uniquement qualitative et que les techniques utilisées étaient d'une extrême simplicité : le mélange de deux gouttes d'antisérum, de 0,2 ml d'une dilution donnée d'une azoprotéine et d'une goutte d'une solution d'haptène donnait lieu ou non à une précipitation visible dont l'intensité était évaluée par un, deux ou trois signes «plus». Des observations semblables, traduisant l'hétérogénéité des anticorps, avaient été faites avec des antigènes naturels, mais elles étaient généralement interprétées comme étant dues à l'existence de différents déterminants antigéniques. Une telle interprétation, sans doute souvent valable pour les antigènes naturels, ne pouvait être retenue dans le cas des anticorps anti haptènes.

Au cours de leur étude quantitative de la compétition entre haptènes et antigènes, *PAULING*, *PRESSMAN* et *GROSSBERG* (1944) ont montré, nous l'avons vu, que l'hétérogénéité des anticorps envers

l'haptène homologue pouvait être décrite par une fonction d'erreur. L'indice d'hétérogénéité de cette fonction s'accroît lorsque l'haptène inhibiteur est hétérologue, et cela d'autant plus que, par suite de modifications de structure plus importantes, l'haptène présente une constante d'association moyenne plus faible. En d'autres termes, plus l'haptène hétérologue diffère de l'haptène homologue, plus les anticorps se révèlent hétérogènes à son égard.

Les résultats que nous avons obtenus traduisent très clairement une telle situation : les anticorps apparaissent pratiquement homogènes vis-à-vis de l'azotyrosine homologue et de l'acide sulfanilique, mais très hétérogènes envers l'azotyrosine hétérologue. Ces études ayant été effectuées sur l'ensemble des globulines, il faut se demander si les déplacements d'équilibre observés avec TpS et TmS sont dus aux mêmes anticorps. On pourrait supposer que l'hétérogénéité observée dans l'étude de la réaction croisée est due à l'existence de plusieurs groupes d'anticorps dont un seul interviendrait effectivement dans l'analyse effectuée avec l'haptène homologue. Cette hypothèse doit cependant être écartée : en effet, si un ou plusieurs groupes d'anticorps qui manifestent une affinité élevée à l'égard de l'haptène hétérologue n'intervenaient pas dans les résultats obtenus avec l'haptène homologue, il faudrait nécessairement supposer qu'ils ont pour l'haptène homologue une affinité faible. Or par la méthode d'inhibition, nous n'avons pas détecté d'anticorps ayant pour l'haptène hétérologue une affinité plus grande que pour l'haptène homologue. Ce sont bien les mêmes anticorps qui se révèlent pratiquement homogènes vis-à-vis de l'azotyrosine homologue et très hétérogènes vis-à-vis de l'azotyrosine hétérologue.

On peut tenter d'interpréter ce fait en supposant que les sites spécifiques des anticorps, bien que se combinant à l'haptène homologue avec des affinités peu différentes entre elles, auraient en fait des structures assez diverses. Une autre hypothèse serait que les sites spécifiques appartiennent à des anticorps dont la configuration globale et les propriétés physicochimiques non spécifiques seraient différentes. L'étude thermodynamique des propriétés de diverses isoagglutinines humaines a apporté un ensemble de données qui mettent en évidence le rôle joué au cours de la réaction antigène anticorps non seulement par les sites spécifiques, mais par l'ensemble de la molécule d'anticorps (WURMSER, FILITTI-WURMSER, JACQUOT-ARMAND et AUBEL LESURE). Cette contribution «non spécifique» de l'ensemble de la molécule de globuline à l'énergie de liaison pourrait être plus importante pour l'haptène hétérologue, mal adapté au site spécifique, que pour l'haptène homologue, bien adapté.

Quoi qu'il en soit le fait qu'une même fraction d'une population d'anticorps puisse apparaître relativement homogène à l'égard de l'haptène homologue, mais se révéler très hétérogène à l'égard d'un haptène hétérologue, suggère que l'hétérogénéité est «essentielle» plutôt que «résultante», c'est-à-dire qu'elle semble liée aux mécanismes même de la synthèse et aux propriétés générales des globulines.

L'existence d'une hétérogénéité très marquée, qu'elle soit essentielle ou résultante, apparaît d'autant plus significative que l'homogénéité des propriétés d'affinité spécifique de certaines populations de protéines peut être très clairement démontrée. L'un des cas les plus frappants à cet égard est celui des isohémagglutinines normales dont l'homogénéité, à l'intérieur d'une classe génotypique, a été mise en évidence par les travaux de *FILITTI-WURMSER* et *WURMSER*. Il faut mentionner également le cas de la β galactosidase dont l'homogénéité à l'égard de divers analogues non métabolisables du substrat a été démontrée par dialyse à l'équilibre (*COHN*, 1957). Par extension on doit faire l'observation que la majorité des systèmes enzymatiques étudiés dans des conditions adéquates obéissent de façon satisfaisante à la loi de *HENRI MICHAELIS* alors qu'une hétérogénéité marquée de la population de molécules, en ce qui concerne l'affinité spécifique, devrait se traduire par une déviation par rapport à cette loi.

VII - CONCLUSIONS

Grâce à l'emploi d'haptènes radioactifs, les déterminations d'équilibre effectuées par dialyse ont pu être faites en présence de concentrations extrêmement faibles d'haptène. De ce fait, l'analyse porte électivement, sans aucun fractionnement préalable, sur les anticorps de haute affinité pour l'haptène utilisé.

L'analyse des globulines provenant d'animaux immunisés avec un seul antigène nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- Les anticorps se sont révélés pratiquement homogènes vis-à-vis de l'haptène homologue, dans les limites d'erreur des déterminations et pour des concentrations d'haptène libre variant de $0,3$ à 30.10^{-7} M.

- Dans les mêmes conditions, ces mêmes anticorps apparaissent très hétérogènes quant à leur affinité pour un haptène hétérologue.

- L'étude de l'inhibition de la fixation d'une très faible quantité d'un haptène hétérologue radioactif par des quantités croissantes de

l'haptène homologue ou de ce même haptène hétérologue, non radio-actifs, ne permet pas de détecter d'anticorps ayant pour l'haptène hétérologue une affinité plus élevée que pour l'haptène homologue.

- Les antigènes utilisés ne différaient que par l'haptène couplé par diazotation à une même protéine. Les deux haptènes qui nous ont permis l'étude de la réaction croisée étaient les acides para ou méta amino benzène sulfoniques. Nos résultats montrent que ces deux acides réagissent de façon peu différente avec les anticorps homologues de l'un ou de l'autre de ces deux azoprotéines, mais qu'ils se différencient très nettement lorsqu'ils sont unis par une liaison azoïque à la tyrosine ou à l'histidine. L'originalité de chacun de ces haptènes conjugués et, de même, des motifs antigéniques, tient donc à la position relative dans l'espace du radical benzène sulfonique et du radical acide aminé.

CHAPITRE IV

ÉVOLUTION DES PROPRIÉTÉS SPÉCIFIQUES DES ANTICORPS ANTI HAPTÈNES AU COURS DE RÉACTIONS DE RAPPEL HOMOLOGUES OU HÉTÉROLOGUES

Au cours du chapitre précédent nous avons défini des conditions analytiques qui nous semblaient devoir permettre une étude précise du rappel hétérologue, les résultats obtenus avec des antigènes complets, au cours du chapitre II, ayant présenté une signification ambiguë. Nous nous proposons tout d'abord de comparer les propriétés des anticorps anti haptènes obtenus avant et après une injection de rappel homologue. Puis nous rechercherons dans quelle mesure l'évolution ainsi observée est modifiée lorsque l'antigène secondairement injecté présente des motifs hapténiques distincts quoique très voisins de ceux de l'antigène primitivement injecté (rappel hétérologue). Nous envisagerons également le cas où les motifs hapténiques des deux antigènes successivement injectés ne présentent pas de réaction croisée, la partie protéinique de ces antigènes étant identique.

Les conditions expérimentales sont celles qui ont été précédemment décrites. Des comparaisons seront établies entre les globulines prélevées immédiatement avant et six jours après l'injection de rappel.

I - RAPPEL HOMOLOGUE

La comparaison des propriétés spécifiques des globulines obtenues avant et après une injection de rappel homologue a été réalisée dans deux conditions différentes : soit à même concentration en globulines

totales, soit à même concentration en anticorps spécifiques de l'azotyrosine homologue. L'analyse a été effectuée par dialyse à l'équilibre en présence de concentrations croissantes de TpS, de TmS ou d'acide sulfanilique.

La figure 15 est l'expression graphique des résultats obtenus lorsque l'analyse est effectuée sur des solutions de globulines de même concentration totale. Les deux droites relatives à l'azotyrosine

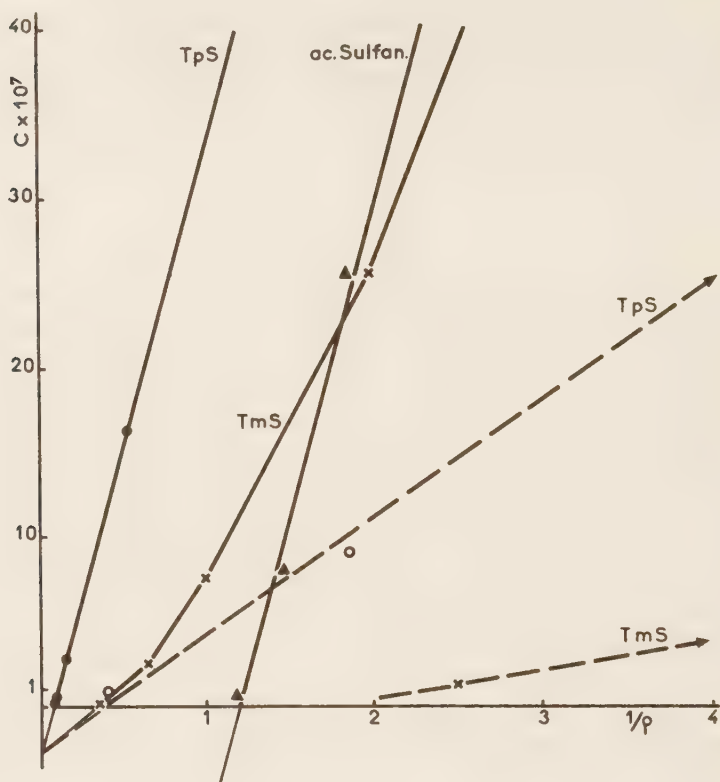


Figure 15 - Analyse des globulines du lapin A 406 (première et deuxième injections AHpS). En tirets : résultats obtenus avec les globulines prélevées avant le rappel. En traits pleins : résultats obtenus avec les globulines prélevées six jours après le rappel. Dans chaque cas la densité optique est égale à $10 \cdot$ Haptènes TpS, TmS, acide sulfanilique. TpS : avant le rappel $nM = 6,8 \cdot 10^{-7}$, $K_D = 2,4 \cdot 10^{-7}$; après le rappel $nM = 3,6 \cdot 10^{-6}$, $K_D = 2,4 \cdot 10^{-7}$. Les flèches, terminant les droites en tirets, indiquent que nous avons obtenu des points expérimentaux qui sont en dehors des limites du graphique.

homologue (TpS) se coupent sur l'axe des ordonnées : l'injection de rappel a entraîné dans ce cas un accroissement d'environ cinq fois de la concentration des sites spécifiques, mais la constante de dissociation est restée inchangée. Pour tirer parti de ce résultat, et en même temps le confirmer, nous avons alors ajusté les concentrations des deux préparations de globulines, obtenues avant et après l'injection de rappel de façon que les deux droites caractéristiques obtenues pour l'azotyrosine homologue se superposent sur le graphique. Cet ajustement est

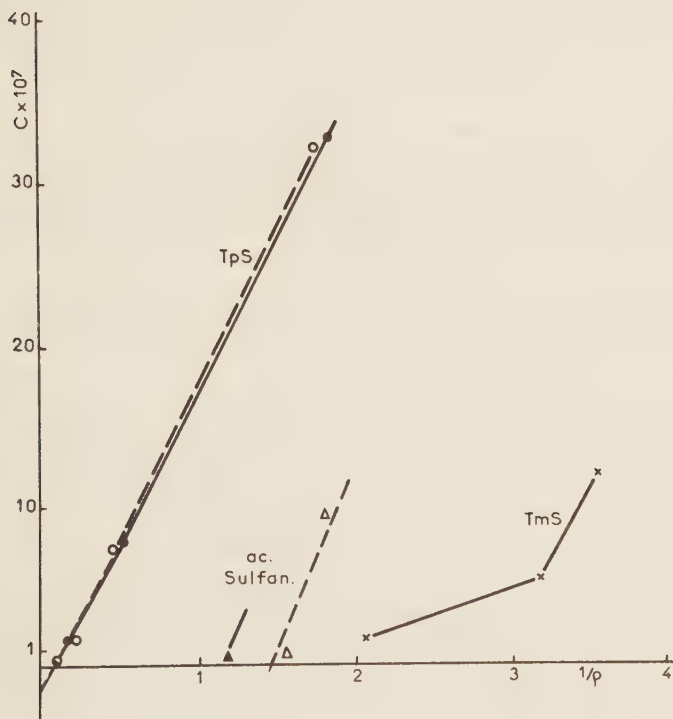


Figure 16 - Analyse des globulines du lapin A 405 (première et deuxième injections AHpS). En tirets, globulines prélevées avant le rappel (densité optique = 30). En traits pleins, globulines prélevées après le rappel (densité optique = 7,7). Haptènes : TpS ($nM = 1,8 \cdot 10^{-6}$, $K_D = 1,1 \cdot 10^{-7}$), TmS et acide sulfanilique. Avant le rappel, les globulines n'entraînent aucun déplacement mesurable de TmS, même aux plus faibles concentrations utilisées.

possible si les différences entre ces deux préparations de globulines sont uniquement d'ordre quantitatif, vis-à-vis de TpS. Sa réalisation technique est alors facile puisque les pentes de ces droites sont proportionnelles aux concentrations des sites spécifiques.

Les résultats ainsi obtenus pour les globulines d'un autre lapin immunisé dans les mêmes conditions sont présentés dans la figure 16. Les deux droites définies pour TpS se superposent exactement et ce fait est certainement significatif puisque la précision des déterminations effectuées est bonne dans la région du graphique où sont distribués les points expérimentaux. A l'égard de l'azotyrosine homologue, les modifications entraînées par l'injection de rappel paraissent donc être uniquement d'ordre quantitatif. Cependant la population d'anticorps a subi des modifications qualitatives. Ces deux préparations de globulines qui paraissent identiques à l'égard de l'azotyrosine homologue réagissent différemment à l'égard des autres haptènes : les globulines obtenues avant le rappel n'entraînent aucun déplacement détectable de l'haptène hétérologue TmS, même aux plus faibles concentrations d'haptènes utilisables, alors que les globulines obtenues après l'injection de rappel concentrent cet haptène de façon mesurable. Ce fait traduit dans les termes propres à nos expériences une observation fréquemment faite à propos de sérums antiprotéines : celle de l'«élargissement» de la spécificité des antisérums à la suite d'injections répétées d'un même antigène.

L'examen de la figure 16 révèle en outre que les deux préparations de globulines étudiées diffèrent par leur réactivité pour l'acide sulfanilique (Ce décalage vers la gauche, à la suite de l'injection de rappel, des points expérimentaux définis pour l'acide sulfanilique peut être aussi observé sur la figure 18, mais il s'agit dans ce cas d'un rappel hétérologue). Ce dernier résultat ne peut certainement pas être considéré comme établi. Néanmoins il semble qu'il mériterait d'être confirmé - ou infirmé - par une étude systématique. En effet l'acide sulfanilique n'est pas un haptène hétérologue mais un élément du motif antigénique homologue. Notre observation semble indiquer qu'il se produit, en cours d'immunisation, un accroissement relatif de l'affinité des immunoglobulines pour la partie du motif antigénique qui en est le chaînon terminal et qui présente le radical acide. Ceci suggère l'hypothèse que l'«élargissement de spécificité» généralement observé à la suite d'injections répétées d'un même antigène pourrait être dû au rôle de plus en plus important joué dans la détermination de la spécificité des anticorps par certains fragments du site antigénique. Ces fragments auraient plus de chance de se retrouver à peu près identiques dans différents antigènes de structure voisine que la totalité du site antigénique de

complexité structurale beaucoup plus grande. Nos résultats montrent seulement la possibilité d'aborder directement, par la technique de dialyse à l'équilibre, un tel problème. Notons que des études très récentes des réactions croisées entre les polyosides de certaines *Salmonella* ont montré qu'au cours de l'immunisation apparaissent des anticorps étroitement spécifiques du sucre terminal. Ces anticorps ne sont pas détectables dans les sérums de lapins immunisés pendant une période courte (STAUB, TINELLI, LUDERITZ et WESTPHAL, 1959).

Le but de notre travail étant d'étudier l'évolution des populations d'anticorps au cours du rappel hétérologue, il était essentiel de montrer que le phénomène d'«élargissement de spécificité» se manifeste dans les conditions particulières à nos expériences, au cours d'un rappel homologue et ceci quel qu'en soit par ailleurs le mécanisme supposé.

II - LE DEUXIEME ANTIGENE INJECTE NE PRESENTE PAS DE REACTIONS CROISEES AVEC LES MOTIFS HAPTENIQUES DU PREMIER

Nous avons injecté successivement deux antigènes ayant la même partie protéinique, mais présentant des motifs hapténiques sans réactions croisées. C'est le cas par exemple, nous l'avons vu, de AHpS et de AHpAs : des globulines homologues de AHpS ne déplacent pas TpAs même lorsque cet haptène est utilisé à des concentrations de 10^{-7} M, et inversement les globulines homologues de AHpAs ne concentrent pas TpS. Cette absence de réaction croisée entre ces deux haptènes a été confirmée par la méthode d'inhibition (figure 13).

Le but de ces expériences de contrôle était double : tout d'abord de rechercher si l'introduction dans l'organisme de motifs hapténiques nouveaux, chimiquement liés à une protéine envers laquelle l'individu est déjà immunisé, entraîne la formation d'anticorps qui sont spécifiquement adaptés à cet haptène et ceci selon la cinétique caractéristique d'une réaction de rappel. L'autre objectif de ces expériences était de voir si la quantité des anticorps spécifiques des motifs hapténiques du premier antigène était modifiée à la suite d'une telle injection secondaire qui déclenche un phénomène de rappel pour les anticorps antiprotéines.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans le tableau VII. Les motifs hapténiques nouveaux secondairement injectés n'entraînent pas la formation en quantité détectable d'anticorps qui leur soient spécifiquement adaptés. C'est en somme le résultat qui aurait été obtenu si l'injection avait été faite dans les mêmes conditions à un animal non encore immunisé.

TABEAU VII
Valeurs maximums de ρ avant et après le rappel

N° des lapins	Première injection	Deuxième injection	Valeurs de ρ			
			Avant le rappel		Après le rappel	
			TpS	TpAs	TpS	TpAs
A 402	AHpS	AlIpAs	8,5	0	7	0
A 404	AHpS	AHpAs	1,04	0	2,12	0
A 410	AlIpAs	AHpS	0	0,3	0	0 4
A 463	AHpS	néant	5,33	0	4,9	0
A 464	AHpS	néant	6,5	0	7,7	0

Tableau VII - Les valeurs de ρ ont été déterminées pour des solutions de globulines ramenées à la même concentration (densité optique 10). Au début de l'expérience de dialyse, la concentration d'haptène était de 10^{-7} M dans chaque compartiment, c'est-à-dire la concentration la plus faible que nous ayons pratiquement utilisée.

A la fin de la première phase de l'immunisation, on peut déterminer des valeurs de ρ , parfois élevées, par analyse des globulines en présence de l'azotyrosine homologue à concentration minimum. Six jours après l'injection de rappel, ces valeurs de ρ sont un peu différentes : légèrement supérieures dans deux cas, légèrement inférieures dans un cas. Mais ces fluctuations sont de peu d'amplitude et elles semblent du même ordre que celles observées lorsqu'aucune injection secondaire n'est effectuée, bien que les saignées soient faites aux mêmes temps. On peut donc considérer que l'injection secondaire effectuée avec un antigène entièrement différent, quant à ses motifs hapténiques, ne modifie pas de façon significative l'évolution normale chez ces animaux de leurs populations de globulines anti haptènes.

III - RAPPEL HETEROLOGUE

Les conditions du rappel hétérologue ont été réalisées en injectant AHmS à un animal ayant reçu une première injection de AHpS ou, inversement, par injection de AHpS à un animal préalablement immunisé avec AHmS.

Dans le tableau VIII chaque préparation de globulines obtenues avant ou après l'injection de rappel homologue ou hétérologue est caractérisée par la valeur expérimentale ρ déterminée à des concentrations de TpS et de TmS libres inférieures ou égales à 10^{-7} M, la concentration des solutions de globulines étant la même. Il est évident que AHpS et AHmS ont entraîné une réaction de rappel dont l'intensité est comparable, quel que soit celui de ces deux antigènes qui a été utilisé pour la première injection. Il ressort très clairement de l'examen du tableau VIII que les globulines obtenues après l'injection de rappel se classent en deux groupes seulement selon que la première injection a été effectuée avec AHpS ou avec AHmS. La spécificité des anticorps obtenus à la suite de l'injection de rappel ne semble pas affectée par la nature de l'antigène injecté secondairement.

Toutefois les valeurs de ρ rapportées dans ce tableau ne caractérisent, nous l'avons vu, ni l'affinité ni la quantité des anticorps réagissant avec chacun de ces deux haptènes. Ces résultats, dans leur simplicité et leur netteté, donnent une première indication sur le sens de la réponse que nous recherchons, ils ne suffisent pas à la définir.

TABLEAU VIII
Valeurs maximums de ρ avant et après le rappel

N° des lapins	Première injection	Deuxième injection	Valeurs de ρ			
			Avant le rappel		Après le rappel	
			TpS	TmS	TpS	TmS
A 406	AHpS	AHpS	2,4	0,4	14	2,4
A 461	AHpS	AHpS	3,4	0,4	8,8	0,6
A 466	AHpS	AHpS	6,1	0,18	14,8	1,8
A 403	AHpS	AHmS	0,9	0,55	3,6	1,28
A 467	AHpS	AHmS	0,13	0,03	8,4	1,7
A 468	AHpS	AHmS	2,5	0,11	6,5	0,57
A 438	AHmS	AHmS	0,1	4,3	1,2	8,1
A 440	AHmS	AHpS	0,22	4,2	1,1	7,3

Les valeurs de ρ ont été déterminées vis-à-vis de solutions de globulines obtenues avant et après le rappel et ramenées à la même concentration. Au début de l'expérience de dialyse la concentration d'haptène était de 10^{-7} M dans chaque compartiment, c'est-à-dire la concentration initiale la plus faible que nous ayons utilisée.

Nous avons donc analysé ces diverses préparations de globulines en présence de quantités croissantes des différents haptènes. Les propriétés des globulines prélevées avant ou après l'injection de rappel hétérologue ont été comparées soit à même concentration en globulines (figure 17), soit à même concentration en anticorps mis en évidence par l'azotyrosine correspondant au premier antigène (figure 18).

Dans le cas rapporté figure 17, les globulines obtenues avant l'injection de rappel présentent une réactivité anormalement voisine pour TpS et TmS, alors que l'immunisation a été réalisée, jusqu'à ce stade, uniquement avec AHpS. Cette circonstance est en fait particulièrement favorable pour étudier l'effet d'une injection secondaire de AHmS.

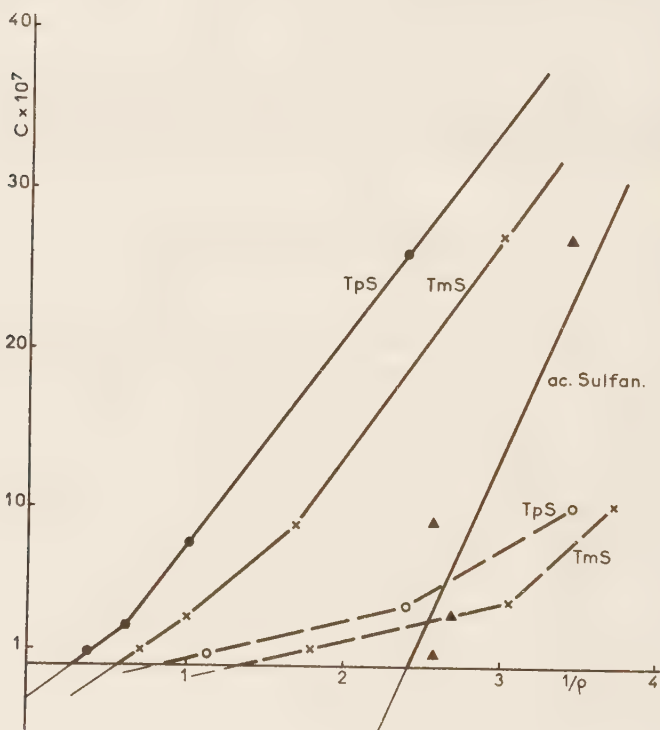


Figure 17 - Analyse des globulines du lapin A 403 (première injection AHpS, deuxième injection AHmS). En tirets, globulines prélevées avant le rappel. En traits pleins, globulines prélevées six jours après le rappel. Dans chaque cas la densité optique est égale à 10 - Haptènes : TpS, TmS et acide sulfanilique.

L'effet de cette injection est d'entraîner un accroissement de la pente des deux courbes définies vis-à-vis des azotyrosines, ce qui traduit une augmentation d'environ trois fois de la quantité des anticorps présents. Mais ce graphique ne permet de distinguer aucune modification qualitative de la population d'anticorps : les propriétés manifestées sont celles d'anticorps anti AHpS.

Afin de comparer dans des conditions plus précises l'évolution relative de l'affinité des anticorps pour les deux azotyrosines, nous avons ajusté les concentrations des solutions de globulines, obtenues avant et après le rappel hétérologue, de façon que les points expérimentaux, déterminés pour l'azotyrosine correspondant au premier antigène, se superposent sur notre graphique. Cette analyse a été effectuée (figure 18) sur les globulines d'un animal immunisé successivement avec AHpS

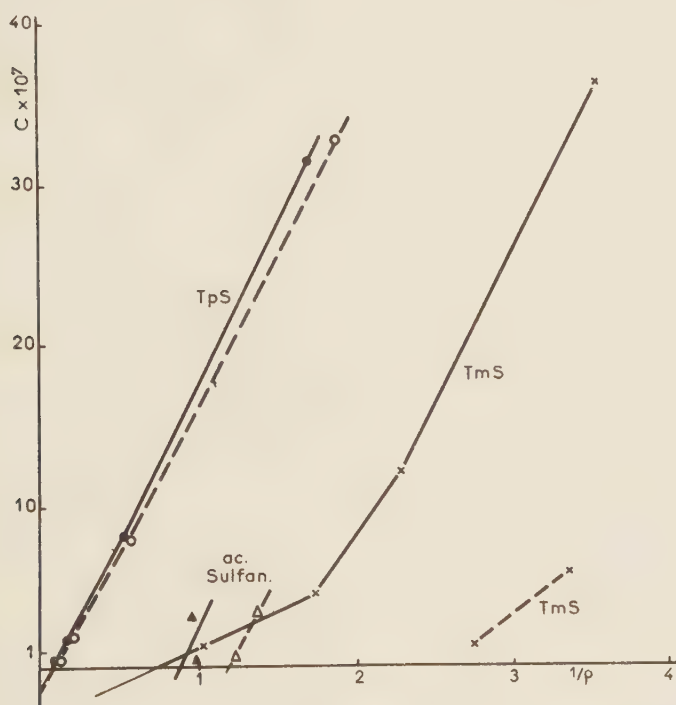


Figure 18 - Analyse des globulines du lapin A 468 (première injection AHpS, deuxième injection AHmS). En tirets, globulines prélevées avant le rappel (densité optique = 30). En traits pleins, globulines obtenues six jours après le rappel (densité optique = 15) - Haptènes : TpS, TmS, acide sulfanilique.

et AHmS. L'intensité de la réaction de rappel a été, dans ce cas, assez faible : pour obtenir la superposition des courbes relatives à TpS, il a été suffisant d'utiliser des concentrations de globulines qui, pour les deux préparations, étaient dans le rapport de un à deux. Qualitativement cependant les résultats sont analogues à ceux qui ont été obtenus dans les mêmes conditions pour un rappel homologue (figure 16).

Ces analyses montrent que la population d'anticorps obtenue par injection de AHpS puis de AHmS présente dans son ensemble les mêmes caractéristiques que celle obtenue à la suite de deux injections de AHpS. Il est cependant extrêmement difficile de savoir si l'accroissement relatif de la réactivité envers TmS, c'est-à-dire l'«élargissement de spécificité», est plus ou moins marqué selon que AHpS ou AHmS est injecté secondairement à AHpS. En effet, d'un individu à un autre, la variabilité des résultats obtenus pour un haptène hétérologue donné est très grande et une étude, par cette méthode analytique, portant sur un nombre élevé d'animaux impliquerait un travail démesuré. La comparaison des résultats présentés dans les figures 17 et 18 d'une part, 15 et 16 d'autre part et l'examen de l'ensemble des déterminations rassemblées dans le tableau VIII montrent qu'une telle différence, si elle existe, est en tous les cas peu marquée.

Une autre possibilité reste à envisager, c'est qu'une injection de rappel hétérologue entraîne non seulement, comme nous venons de le voir, la formation d'anticorps qui, par leur spécificité, correspondent au premier antigène, mais aussi, peut-être en quantité relativement faible, d'anticorps mieux adaptés à l'azotyrosine de l'antigène de rappel qu'à l'azotyrosine du premier antigène. Nous avons pu mettre en évidence la présence de tels anticorps par la technique d'inhibition.

Les divers arguments de cette démonstration sont tirés des faits rassemblés dans la figure 19. Les deux graphiques supérieurs de cette figure rappellent des résultats que nous avons déjà analysés au cours de l'étude des anticorps obtenus par deux injections du même antigène (chapitre III). Rappelons que lorsqu'on emploie des concentrations aussi faibles que possible de l'azotyrosine hétérologue radioactive, on constate que cet haptène est toujours déplacé plus efficacement par l'azotyrosine homologue que par l'azotyrosine hétérologue. Ce fait signifie que, même lorsqu'on fait porter électivement l'analyse sur les anticorps qui ont pour l'haptène hétérologue envisagé l'affinité maximum, on ne peut déceler d'anticorps qui auraient plus d'affinité pour cet haptène hétérologue que pour l'haptène homologue.

Les deux graphiques médians de la figure 19 montrent les résultats obtenus lors du rappel hétérologue. Les populations d'anticorps obtenues dans ces conditions ont dans leur ensemble, nous l'avons vu, des

propriétés spécifiques déterminées par le premier antigène injecté. Mais si l'on ajoute à ces globulines une quantité très faible de l'azotyrosine radioactive correspondant au premier antigène, cet haptène est déplacé de façon plus efficace par l'azotyrosine du second que par l'azotyrosine du premier antigène. En d'autres termes, ces conditions d'immunisation ont fait apparaître dans les délais normaux d'une réaction de rappel des anticorps qui ont, pour les motifs hapténiques du deuxième antigène injecté, une affinité plus élevée que pour les motifs du premier, et que nous devons par conséquent considérer comme des anticorps homologues de l'antigène du rappel. Rappelons qu'une injection d'azoprotéine à un

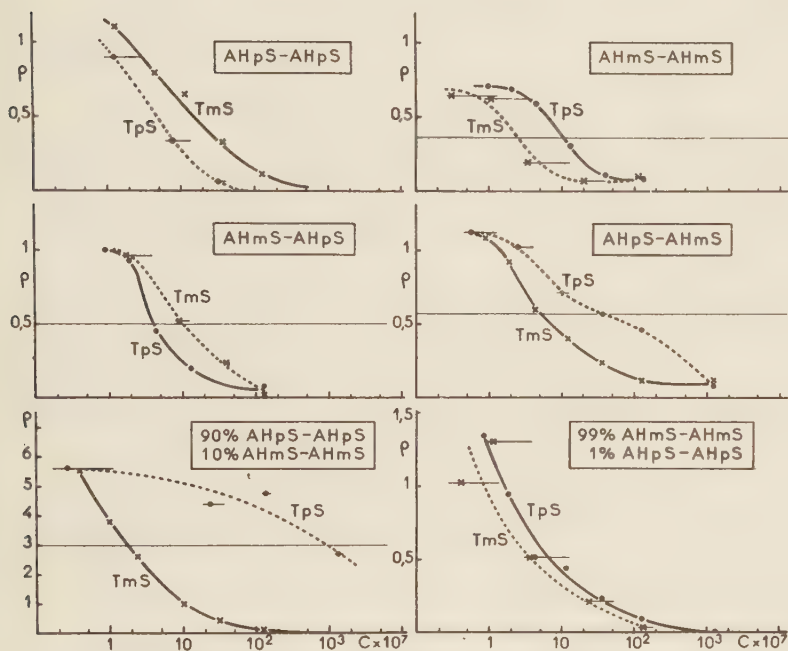


Figure 19 - Technique d'inhibition - Dans chaque graphique est indiquée la nature des deux antigènes successivement injectés au lapin dont les globulines sont analysées. Les courbes en traits pleins correspondent à l'haptène dont un échantillon radioactif a été ajouté en quantité très faible. Les courbes en tirets correspondent à l'haptène utilisé uniquement comme inhibiteur. Graphiques supérieurs : globulines du lapin A 466 à gauche, A 438 à droite. Graphiques médians : globulines du lapin A 440 à gauche, A 403 à droite. Graphiques inférieurs : expériences de reconstitution par mélange des globulines provenant des lapins A 406 et A 438.

animal non immunisé au préalable n'entraîne l'apparition d'aucun anticorps anti haptène détectable, même dans les délais plus longs de la réponse primaire, et qu'en l'absence d'adjuvant, plusieurs injections répétées sont nécessaires pour que ces anticorps puissent être mis en évidence. Cette situation est complètement modifiée lorsque l'animal a été soumis à une immunisation avec un antigène de structure voisine : le premier contact avec l'antigène déclenche alors, outre une production accrue des types d'anticorps précédemment synthétisés, la formation rapide d'anticorps qui sont spécifiques de ce nouvel antigène.

La validité de cette méthode d'analyse et sa sensibilité sont démontrées par des expériences de reconstitution dont deux exemples sont présentés dans les deux graphiques inférieurs de la figure 19. Des globulines homologues de AHmS et de AHpS, contenant des quantités sensiblement égales d'anticorps, sont mélangées en proportions variables. La présence de 10 % d'anticorps d'un certain type est aisément démontrée (graphique de gauche) et les résultats sont encore nets pour 5 %. Lorsque le composant mineur ne représente plus que 1 % des anticorps totaux (graphique de droite) la position relative des deux courbes s'inverse mais l'écart entre ces courbes est cependant moins grand, de façon significative, que celui observé dans le cas où aucune globuline anti AHpS n'est ajoutée à ces mêmes globulines anti AHmS (graphique supérieur droit).

En se basant sur les résultats obtenus pour les anticorps homologues de l'un ou de l'autre de ces antigènes et pour des mélanges en proportions variables de ces deux types d'anticorps, on peut estimer que dans les populations résultant d'un rappel hétérologue, les anticorps homologues de l'antigène du rappel représentent de l'ordre de 5 % de la quantité des anticorps homologues de l'antigène primitif. Mais nous supposons ainsi que les populations d'anticorps obtenues à la suite d'un rappel hétérologue peuvent être assimilées à un mélange d'anticorps homologues des deux antigènes. Il n'est pas possible d'affirmer que tel est le cas. Le problème ainsi posé nécessiterait de nouvelles recherches.

Remarquons que le dernier résultat que nous venons d'obtenir est en contradiction apparente avec certaines observations faites au cours de l'étude du rappel hétérologue avec les antigènes complets (chapitre II). Dans ce cas, rappelons-le, des injections espacées d'albumine humaine (AH) puis de la même protéine diazotée (AHD) n'avaient pas provoqué l'apparition d'anticorps « spécifiques pour AHD ». Il est possible que dans ce dernier cas des anticorps « spécifiques pour AHD » aient pu apparaître mais qu'ils aient été éliminés *in vitro* au cours de la précipitation par AH si, comme il est possible de le supposer, ces

anticorps ont dans ces conditions une affinité pour AH qui n'est pas négligeable. Mais nous avons suffisamment insisté sur les difficultés d'interprétation de ces premiers résultats.

C'est semble-t-il sans ambiguïté que les résultats obtenus par la technique d'inhibition montrent qu'une partie des anticorps anti haptènes obtenus au cours de la réaction de rappel hétérologue sont mieux adaptés à l'haptène du rappel qu'à l'haptène primitif.

IV - CONCLUSIONS

Nous résumerons brièvement les principaux résultats acquis au cours de cette étude, la discussion de ces observations étant réservée au chapitre suivant.

1 - Au cours d'un rappel homologue, les analyses effectuées avec l'azotyrosine homologue traduisent un accroissement de la quantité d'anticorps mais la constante de dissociation définie pour cet haptène reste apparemment inchangée. Cependant la population d'anticorps subit des modifications qualitatives : nous avons ajusté les concentrations de solutions de globulines prélevées avant et après le rappel de façon que ces préparations soient identiques à l'égard de l'azotyrosine homologue. Il ressort de la comparaison effectuée dans ces conditions que les globulines obtenues après le rappel réagissent mieux, non seulement avec l'azotyrosine hétérologue, ce qui traduit l'«élargissement de spécificité» qu'il est classique d'observer en cours d'immunisation, mais aussi avec l'acide sulfanilique, ce qui suggère que certains fragments des motifs antigéniques pourraient jouer un rôle de plus en plus important dans la détermination de la spécificité des anticorps.

2 - Lorsque l'antigène secondairement injecté présente des motifs hapténiques entièrement différents des motifs du premier antigène, il n'apparaît à la suite de cette injection aucun anticorps spécifique de ces nouveaux motifs. Une telle injection ne modifie pas non plus, de façon significative, l'évolution normale au cours du temps des propriétés des globulines envers les premiers motifs hapténiques injectés.

3 - L'analyse en présence de concentrations croissantes d'azotyrosine et d'acide sulfanilique, des globulines prélevées avant et après une injection de rappel hétérologue, donne des résultats très proches de ceux que l'on obtient dans le cas du rappel homologue : la spécificité

des anticorps formés au cours du rappel paraît donc déterminée essentiellement par les motifs hapténiques du premier antigène injecté. Ce résultat confirme les conclusions de nos premières expériences effectuées avec des antigènes complets. La réexpression d'une information antérieurement acquise traduit l'existence d'un « effet de mémoire » qui apparaît comme un critère qualitatif permettant de distinguer une réaction de rappel d'une réaction primaire : une injection primaire n'entraîne pas la formation d'anticorps mieux adaptés à un autre antigène qu'à l'antigène injecté.

Au cours du rappel hétérologue, l'ensemble des anticorps d'affinité élevée pour les haptènes utilisés acquiert une meilleure adaptation à l'azotyrosine correspondant à l'antigène du rappel, mais ce fait s'observe également dans le cas du rappel homologue, sans que ce motif original soit jamais présent dans l'organisme. Il est difficile de préciser si l'« élargissement de la spécificité » est plus ou moins marqué lorsque le rappel est hétérologue.

La technique d'inhibition nous a permis de faire porter électivement l'analyse, sans aucun fractionnement préalable, sur les anticorps ayant, pour l'azotyrosine correspondant au deuxième antigène injecté, l'affinité maximum. Ainsi il a été possible de montrer qu'une partie des anticorps formés au cours du rappel hétérologue est mieux adaptés à l'azotyrosine correspondant à l'antigène du rappel qu'à l'azotyrosine correspondant au premier antigène.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION GÉNÉRALE

Nous nous sommes proposés au début de cette étude de préciser le rôle joué par l'antigène au cours du phénomène de rappel considéré comme une des manifestations essentielles de la réponse immunitaire. Une détermination critique de ce rôle nous a paru possible par la comparaison des propriétés spécifiques des anticorps présents avant et après une injection de rappel, en particulier lorsque l'antigène de rappel, différant de l'antigène primitivement injecté, présente avec lui une réaction croisée due à de grandes analogies structurales. Notre objectif a été de savoir si les caractéristiques des anticorps sont alors déterminées par l'antigène primitivement injecté ou par l'antigène du rappel.

Nos premières expériences, décrites dans le chapitre II portaient sur l'analyse d'anticorps anti protéines. Les deux antigènes utilisés étaient l'albumine humaine et cette même albumine couplée par diazotation à un acide arylaminé. Les techniques d'hémagglutination passive mises en œuvre nous permettaient de distinguer deux types d'anticorps dans des antisérums homologues de l'albumine humaine diazotée selon qu'ils réagissaient ou non avec l'albumine humaine. Les anticorps anti haptènes n'étaient pas détectables dans ces conditions. A la suite de deux injections espacées de ces antigènes, les anticorps formes correspondaient à l'antigène primitivement injecté, quel que soit l'ordre dans lequel ces injections étaient effectuées. Il semblait donc que ce fut seulement l'information structurale acquise au cours de la phase primaire qui fut réexprimée. D'autres faits expérimentaux avaient à la même époque conduit d'autres auteurs à des conclusions similaires, en particulier *DAVENPORT* et ses collaborateurs, (1953-1956). Par contre,

des expériences de *DIXON* et *MAURER* (1955), comportant deux injections espacées de deux protéines sériques provenant d'espèces animales différentes, avaient montré l'apparition d'anticorps spécifiques du deuxième antigène dans les délais normaux d'une réponse secondaire, en même temps d'ailleurs qu'était observé un accroissement des anticorps spécifiques du premier antigène et des anticorps réagissant avec ces deux protéines. Cette contradiction apparente était difficile à interpréter puisque dans les expériences de *DIXON* et *MAURER*, comme dans les nôtres, l'analyse portait uniquement sur des anticorps anti protéines. La configuration des différents déterminants des antigènes, et par conséquent leurs relations structurales, ne pouvaient être connues. D'autre part, les méthodes analytiques utilisées ne permettaient pas de déterminer l'affinité des anticorps pour les diverses structures antigéniques.

Du fait de ces incertitudes, il nous a semblé nécessaire de poser le problème en des termes plus précis. Cette possibilité nous était offerte par l'étude des anticorps anti haptènes.

La méthode de dialyse à l'équilibre permet de déterminer l'énergie de liaison de la combinaison réversible entre ces anticorps et divers haptènes. Peu de travaux ont été effectués dans ce domaine; la nature et la signification des résultats apportés par cette méthode d'investigation ont fait l'objet des discussions présentées à la fin du chapitre III au cours duquel nous avons décrit nos observations relatives aux anticorps formés en réponse à des injections d'un seul antigène. Grâce à l'emploi d'haptènes radioactifs, les déterminations d'équilibre ont pu être faites en présence de concentrations extrêmement faibles d'haptène libre (jusqu'à 3.10^{-8} M). De ce fait, il a été possible, sans aucun fractionnement ni épuisement préalable, de faire porter électivement l'analyse sur les anticorps qui présentent l'affinité la plus élevée pour l'haptène homologue ou un haptène hétérologue, et cela quelle que soit l'hétérogénéité de la population en question.

Pour étudier l'évolution de la spécificité des anticorps à la suite de deux injections espacées d'antigènes de structures voisines, nous avons utilisé des antigènes qui ne différaient que par l'haptène couplé par diazotation à une même protéine. Ces haptènes étaient les acides para ou méta amino benzène sulfoniques. Nos résultats révélèrent que ces deux acides réagissent de façon peu différente avec les anticorps homologues de l'une ou de l'autre des deux azoprotéines mais qu'ils présentent des propriétés très différentes lorsqu'ils sont unis par une liaison azoïque à la tyrosine ou à l'histidine. Les motifs antigéniques se trouvent ainsi définis sans ambiguïté : ils diffèrent uniquement par

la position relative dans l'espace du radical benzène sulfonique et du radical acide aminé. Cette différence de configuration de motifs antigéniques constitués des mêmes éléments est à l'origine de la réaction croisée observée.

Les relations structurales existant entre les différents motifs antigéniques et la nature des résultats que pouvaient apporter à notre étude la méthode de dialyse à l'équilibre ayant été définies, nous avons abordé l'analyse de la réaction de rappel. Au cours du chapitre IV ont été rapportées les différences que nous avons observées dans les propriétés des anticorps obtenus avant et après une injection de rappel effectuée avec un antigène possédant des déterminants hapténiques identiques, voisins ou entièrement différents de ceux de l'antigène primitivement injecté.

En définitive, les résultats essentiels qui se dégagent de l'ensemble de nos observations peuvent être formulés de la manière suivante :

1°) Une injection de rappel effectuée avec un antigène présentant avec l'antigène primitivement injecté une réaction croisée, entraîne principalement la synthèse d'anticorps mieux adaptés au premier antigène qu'au second.

2°) Cependant une telle injection fait apparaître, également dans les délais de la réaction de rappel, mais en moins grande quantité, des anticorps qui présentent une affinité plus élevée pour le second que pour le premier antigène.

3°) Les sérums d'animaux immunisés avec un seul antigène ne présentent jamais de quantités détectables d'anticorps ayant une affinité plus élevée pour un haptène hétérologue que pour l'haptène homologue.

Telles sont les conclusions de notre travail : nous les avons établies en utilisant l'une des méthodes les plus rigoureuses applicables à l'Immunologie. Il serait nécessaire, en particulier pour le troisième résultat de caractère négatif, que ces observations soient confirmées et étendues.

Ces résultats étaient-ils prévisibles par les théories existantes sur la biogénèse des anticorps ? Plus généralement, à quelles conditions ces faits sont-ils compatibles avec les postulats fondamentaux avancés dans ces diverses théories ? C'est dans ces limites que nous envisagerons maintenant de façon critique les hypothèses faites sur le mode d'action de l'antigène.

Nous distinguerons deux groupes de théories que nous appellerons théories « informatrices » et théories « sélectives » selon que l'antigène est supposé apporter une information structurale nouvelle ou sélectionner une information préexistante.

1°) Théories sélectives.

Les structures spécifiques préexistent à l'injection d'Antigène.
EHRlich (1900), *JERNE* (1955), *TALMAGE* (1957) et *BURNET* (1957)

Pour *EHRlich*, *TALMAGE* et, dans une certaine mesure, pour *BURNET*, tous les types de configurations spécifiques susceptibles d'être produits par un individu préexistant, avec toutes leurs caractéristiques, à toute immunisation. L'antigène favorise électivement la synthèse des globulines qui ont pour ces motifs la configuration la mieux adaptée. *JERNE* fait l'hypothèse supplémentaire que la synthèse des globulines s'accompagne d'erreurs : ainsi apparaissent de nouvelles configurations, celles qui présentent une affinité plus élevée pour l'antigène seront sélectionnées. Le processus immunitaire sera caractérisé par la production d'anticorps d'avidité croissante. Dans ces conditions, il suffit de supposer l'existence, avant l'immunisation, d'un petit nombre de molécules ayant pour l'antigène choisi une certaine affinité même faible.

Le mécanisme de sélection supposé par *JERNE* est essentiellement humoral : les globulines circulantes se combinent à l'antigène si elles présentent pour sa structure une certaine affinité. Le complexe ainsi formé pénètre rapidement dans certaines cellules où la présence de cette globuline va entraîner la formation de nouvelles globulines identiques, aux erreurs de copie près. Ces nouvelles globulines vont passer dans la circulation et le processus continuera. Deux objections doivent être faites à cette théorie. La première, envisagée par *JERNE* lui-même, est que l'injection d'anticorps « passifs » puis d'antigène, ne déclenche pas de réaction de rappel, la réponse obtenue est en fait inférieure à une réponse primaire normale. La deuxième objection est qu'un tel mécanisme de reproduction autocatalytique des protéines n'est suggéré par aucun autre phénomène biologique. Il n'en reste pas moins que la théorie de *JERNE* est sans doute celle qui, à l'heure actuelle, permet d'apporter une explication à la plupart sinon à la totalité des caractéristiques biologiques de la réponse immunitaire : anticorps naturels,

réponse secondaire, évolution des anticorps en cours d'immunisation, tolérance immunitaire, absence d'autoanticorps, etc... En supposant que l'antigène sélectionne, à partir d'une population de globulines initialement peu différenciées, des anticorps de haute avidité, *JERNE* a fort habilement tourné la difficulté majeure qui consiste pour les théories sélectives à rendre compte de l'extraordinaire multiplicité de types d'anticorps qu'un individu peut synthétiser.

Les théories de *TALMAGE* et de *BURNET* (1957) supposent l'existence de mécanismes fondamentalement similaires dans la biogénèse des anticorps et dans l'induction enzymatique. Cette analogie ne peut être développée que si les structures qu'un individu est susceptible de produire à la suite d'un contact avec un antigène quelconque préexistent et sont par conséquent en nombre fini. En effet, «le nombre, les types, la structure des enzymes qui peuvent être induits dans une espèce de bactéries, sont strictement limités et déterminés par leur constitution génétique» (*MONOD*).

BURNET, systématisant des considérations émises par *TALMAGE*, suppose l'existence d'un nombre très élevé de clones de cellules mésenchymateuses, chaque type de configuration structurale étant le produit spécifique d'un clone. Cette théorie, dite de «sélection clonale», transpose au niveau cellulaire le processus de sélection moléculaire supposé par *JERNE*. Au cours de la réponse secondaire, *COONS* (1955) a observé sur des coupes de ganglions lymphatiques la répartition en plusieurs amas de cellules chargées d'anticorps. Ces images suggèrent l'existence de clones cellulaires différenciés. Mais nous verrons que les théories informatrices rendent compte également de cette observation. La théorie de sélection clonale a cependant une autre conséquence obligatoire, dont la vérification ou l'infirmité expérimentale constituerait un critère décisif : chaque clone de cellules, et par conséquent chaque cellule ne peut produire qu'un seul type d'anticorps. Si un individu est immunisé simultanément avec deux antigènes entièrement différents, aucune cellule ne doit effectuer la synthèse des deux types d'anticorps correspondants. Très récemment, ce problème a pu être abordé expérimentalement par deux méthodes : la première consiste à rechercher sur des coupes de tissus la présence de cellules qui fixent les deux antigènes rendus identifiables par la nature différente de leur fluorescence (*COONS* 1957, *WHITE* 1958). L'autre méthode repose sur l'étude in vitro de la production d'anticorps par une seule cellule, isolée d'un ganglion lymphatique (*NOSSAL* et *LEDERBERG* 1958, *Melvin COHN* et *LENNOX*, non publié). Les résultats de ces divers travaux ne sont pas concordants. Cependant les récentes expériences de *COHN* et

LENNOX établissent que deux types d'anticorps sans relations immunologiques peuvent être synthétisés par une seule cellule. Si ces résultats sont confirmés, l'hypothèse de sélection clonale devra être abandonnée ou profondément révisée. Quoi qu'il en soit, nous croyons que les résultats que nous avons apportés sont significatifs à l'égard des théories sélectives, indépendamment de la nature humorale ou cellulaire des mécanismes supposés.

Selon les théories sélectives, une ou plusieurs injections d'un même motif antigénique entraînent essentiellement la formation d'anticorps d'affinité plus élevée pour cette configuration que pour des configurations légèrement différentes, mais aussi, dans des proportions que l'imprécision des hypothèses ne permet pas de prévoir, d'anticorps mieux adaptés à ces motifs qu'au motif homologue. Si maintenant une nouvelle injection est effectuée avec un antigène de structure très voisine - et ce sont là les conditions de nos expériences - on doit observer un accroissement de la quantité des anticorps préférentiellement formés au cours de la première partie de l'immunisation, mais aussi la formation en quantité notable d'anticorps mieux adaptés à ce deuxième antigène qu'au premier. En effet, selon *EHRlich* et *TALMAGE*, ce dernier type d'anticorps a déjà bénéficié d'une certaine stimulation au cours de la phase primaire avant d'être plus efficacement sélectionné par le deuxième antigène. Pour *JERNE*, la production accrue de ce type d'anticorps après l'injection de rappel traduit l'évolution des structures spécifiques par suite du processus de sélection naturelle.

Envisagés isolément, les résultats que nous avons obtenus au cours du rappel hétérologue paraissent donc être conformes aux prédictions des théories sélectives. Mais contrairement à ce qu'impliquent ces théories, nous n'avons jamais détecté dans des immunosérums obtenus par injections d'un seul antigène, des anticorps qui aient pour l'haptène homologue une affinité moindre que pour des haptènes légèrement différents. Nous nous proposons de montrer comment cette observation rend en fait difficilement conciliables avec les théories sélectives les faits observés au cours du rappel hétérologue.

Depuis les travaux de *LANDSTEINER* sur les anticorps anti-haptènes, il est démontré que des antisérums toujours distincts sont obtenus en réponse à des motifs hapténiques pouvant ne présenter entre eux que des modifications structurales minimales. La population d'anticorps, dans son ensemble, est toujours mieux adaptée à l'haptène homologue qu'aux haptènes de structure très voisine. Le nombre de configurations qu'un individu est susceptible de synthétiser paraissait

devoir être infini; elles ne pouvaient donc préexister dans l'organisme et l'hypothèse d'EHRlich a été rejetée. TALMAGE oppose que la fréquence des réactions croisées observées suggère l'existence d'un nombre limité de types d'anticorps et il cite un calcul effectué par HAUROWITZ (1956) selon lequel le nombre total d'anticorps pourrait être inférieur à 50 000. Admettons que ce nombre soit fini. La population d'anticorps, dans son ensemble, pourra être mieux adaptée à l'haptène homologue qu'à tout autre; il devra exister aussi des anticorps ayant une affinité plus élevée pour d'autres haptènes que pour l'haptène homologue. Or, la technique d'inhibition que nous avons utilisée permet précisément de détecter de tels composants mineurs dans une population très hétérogène. La sensibilité de cette analyse, due à l'emploi de concentrations extrêmement faibles d'haptènes hétérologues radioactifs, a été démontrée par nos expériences de reconstitutions. Les théories sélectives ne seraient donc conciliables avec ces résultats qu'en supposant expressément que les anticorps mieux adaptés à un haptène hétérologue qu'à l'haptène homologue sont présents, mais en quantité extrêmement faible. Deux ordres de considérations montrent qu'une telle supposition ne paraît pas compatible avec les données de l'expérience elle-même.

Tout d'abord, nos expériences ont montré qu'une fraction importante des anticorps a pour l'haptène hétérologue une constante d'association qui n'est que de deux à dix fois inférieure à celle observée vis-à-vis de l'haptène homologue. Si ce type d'anticorps préexiste dans l'organisme, une immunisation effectuée uniquement avec l'antigène que nous venons de définir comme hétérologue devrait entraîner la synthèse en quantité notable de ces anticorps étant donné leur affinité élevée pour cet antigène. Ou alors il faut supposer que la sélection d'une espèce moléculaire donnée a lieu préférentiellement, au détriment des espèces les plus immédiatement voisines; cette hypothèse arbitraire ne semble pas avoir été envisagée par les auteurs des théories sélectives. Remarquons en outre que, si la sélection était directement fonction de l'affinité des globulines pour l'antigène, cette même hypothèse prévoirait que les anticorps devraient devenir de plus en plus homogènes quant à leur affinité pour l'haptène homologue au cours de l'immunisation, les anticorps d'affinité maximum supplantant tous les autres.

L'autre argument est que l'extension de spécificité observée au cours du rappel hétérologue implique la présence de ces anticorps en quantité suffisante pour qu'ils deviennent mesurables après une seule stimulation par l'antigène correspondant. Cet effet ne peut être expliqué par les théories d'EHRlich et de TALMAGE que si la quantité de ces globulines et de leurs centres formateurs s'est accrue de façon très

sensible au cours de la première phase de l'immunisation. Ces théories ne sont pas compatibles avec leur existence en quantités qui demeureraient indétectables.

Cette deuxième objection n'est pas valable pour la théorie de *JERNE* : si ces anticorps doivent également exister selon cette théorie, la synthèse au cours du rappel hétérologue d'anticorps d'affinité plus élevée pour le nouveau motif hapténique que pour le premier, ne dépend pas de la préexistence de ce type d'anticorps.

Nous n'avons pas observé, comme le suppose la théorie de *JERNE*, un accroissement de la constante d'association au cours d'une réaction de rappel homologue, mais la première phase de l'immunisation, réalisée avec l'adjuvant de *FREUND*, a été assez intense et *JERNE* avait observé qu'une valeur maximum était atteinte assez rapidement, singulièrement dans le cas du lapin.

La théorie de *JERNE* apparaît donc extrêmement souple. Elle est cependant, comme toutes les théories sélectives, en contradiction avec les faits que nous avons observés au cours des immunisations effectuées avec un seul antigène. L'absence dans ces immunsérums d'anticorps mieux adaptés à des haptènes hétérologues qu'à l'haptène homologue ne peut toutefois être affirmée qu'en tenant compte des limites de sensibilité des méthodes utilisées. Cette restriction est inhérente à tout résultat négatif.

Nous allons maintenant envisager les théories informatrices qui rendront nécessairement compte de la stricte complémentarité des sites spécifiques de tous les anticorps pour les motifs antigéniques homologues.

2°) Théories informatrices.

L'Antigène communique à l'organisme une information structurale nouvelle.

Il faut envisager deux groupes de théories informatrices : soit que l'antigène marque lui-même de son empreinte, par contact direct, les globulines au cours de leur synthèse (théories informatrices directes); soit que la transmission de la nouvelle information structurale se fasse par l'intermédiaire des constituants cellulaires qui déterminent les caractéristiques des globulines (théories informatrices indirectes).

Dans le premier cas, la synthèse des anticorps ne peut se produire qu'en présence de l'antigène alors que, dans la seconde éventualité, cette synthèse peut se poursuivre après élimination complète de l'antigène. Mais cette première conséquence ne semble pas actuellement susceptible de vérification expérimentale.

a) Théories informatrices directes.

Ces théories ont été développées successivement par *BREINL* et *HAUROWITZ* (1930), *ALEXANDER* (1932), *MUDD* (1932) et, plus récemment, par *PAULING* (1940) et *HAUROWITZ* (1952). Sous sa forme actuelle cette théorie suppose que la configuration spécifique de l'anticorps est acquise lors du repliement de la chaîne polypeptidique normale des globulines au contact du motif antigénique. Cette théorie a eu un retentissement considérable et occupe encore à l'heure actuelle une position privilégiée. Le mécanisme proposé est simple et net. Etablies à partir de propriétés observées *in vitro*, développées en relation avec de nouveaux faits du même ordre qu'elles avaient amené à découvrir, ces théories n'ont pas tenté de rendre compte également des caractéristiques biologiques de la réponse immunitaire. En particulier elles n'apportent pas d'explication à la différence très généralement observée entre une réponse primaire et une réponse secondaire.

MONOD (1958) a proposé une hypothèse qui permettrait de rendre compte du phénomène de rappel, même dans ses aspects cytologiques décrits par *COONS*, tout en conservant à l'antigène le rôle que lui attribuent les théories de *PAULING* et d'*HAUROWITZ*. Cette hypothèse constitue une tentative d'application à l'Immunologie de la découverte des perméases dans le domaine de l'induction enzymatique : *COHEN* et *MONOD* (1957) ont pu rattacher à la présence de protéines spécifiques inductibles le phénomène de concentration active de l'inducteur. L'analogie envisagée entre l'induction enzymatique et la réponse immunitaire ressort avec une particulière netteté des expériences de *Melvin COHN* (1957) et de *NOVICK* (1957) que nous allons rapidement décrire. *NOVICK* a montré qu'à certaines concentrations suffisamment faibles d'inducteur, la formation de l'enzyme induit est un phénomène du tout ou rien, c'est-à-dire que certaines cellules sont pleinement induites alors que les autres ne le sont pas. L'explication en est simple : dès qu'une ou plusieurs molécules d'inducteur ont provoqué dans certaines cellules la synthèse de quelques molécules de perméase, ces cellules ont acquis un avantage considérable sur les autres cellules génétiquement identiques qui ne peuvent capter l'inducteur qu'à la suite d'un

lent processus de diffusion. Les cellules possédant quelques molécules de perméase concentreront rapidement l'inducteur, formeront davantage de perméase et ces cellules seront bientôt complètement induites. Leur descendance conservera pendant un certain temps cet avantage sélectif par répartition de la perméase entre les cellules filles, même en l'absence d'inducteur : tout se passe dans ces conditions comme s'il était apparu dans la culture un nouveau mutant génétique.

MONOD ne suggère certainement pas que la réponse immunitaire dépend de la présence de perméases telles que celles qui concentrent les galactosides dans les cellules bactériennes, mais il a recherché les conséquences qui découleraient logiquement d'une situation analogue dans ce domaine voisin : à la suite d'un premier contact avec l'antigène un nombre assez restreint de cellules ont participé à la réponse immunitaire, mais ces cellules qui ont capté l'antigène ont formé, outre les anticorps du type classique, des anticorps cellulaires dont le rôle est de capter et d'accumuler l'antigène dans ces cellules. Lorsque l'antigène a pratiquement disparu de la circulation, la synthèse des anticorps cesse, mais la multiplication de ces cellules continue et les anticorps cellulaires sont répartis entre les cellules filles. Si après un certain intervalle de temps, l'antigène est réinjecté, l'effet sera très différent de celui observé après la première injection. Les anticorps du type classique seront formés très rapidement et en quantité beaucoup plus importante puisqu'il existe maintenant un nombre élevé de cellules qui sont capables de capter efficacement l'antigène et par conséquent de synthétiser l'anticorps à un taux maximum. « Le principal avantage de ce modèle est de montrer comment la production d'anticorps peut apparaître comme un phénomène autocatalytique et peut résulter de la multiplication et de la différenciation de clones cellulaires spécialisés, sans recourir à l'hypothèse de la création par l'antigène d'entités auto reproductrices ». (*MONOD*)

Récemment *PAPPENHEIMER* (1958) a adopté un point de vue essentiellement similaire. L'originalité et l'intérêt de son hypothèse résident dans la suggestion que les « anticorps cellulaires » seraient également responsables des phénomènes associés à l'« hypersensibilité retardée » (*PAPPENHEIMER* 1957). De même que l'inducteur, l'antigène entraînerait la synthèse de deux types de structures spécifiques, et, nouvelle analogie, la synthèse de chacune de ces configurations serait sous un contrôle génétique différent : les sujets atteints d'agamma globulinémie, maladie héréditaire, ne peuvent effectuer la synthèse d'anticorps de type classique; il est aisé cependant de faire apparaître chez ces malades un état d'hypersensibilité aux antigènes protéiques.

Ces théories proposent pour expliquer le phénomène de rappel un mécanisme simple. Dans le cas où l'injection de rappel est effectuée avec un antigène présentant des motifs différents quoique très voisins de ceux du premier antigène, ce mécanisme implique une conséquence très précise : les anticorps formés au cours du rappel doivent avoir une configuration strictement complémentaire de l'antigène du rappel. Les résultats que nous avons observés ne sont donc pas compatibles avec ces théories. En effet, si ces théories expliquent l'apparition d'anticorps mieux adaptés à l'antigène du rappel qu'au premier antigène injecté, elles ne rendent pas compte du fait que la grande majorité des anticorps formés au cours du rappel ont une configuration strictement complémentaire du premier antigène injecté. Ce deuxième aspect de nos résultats, qui traduit l'existence d'un véritable effet de mémoire, sera au contraire expliqué par les théories qui supposent la transmission de l'information à des entités subcellulaires auto reproductrices.

b) Théories informatrices indirectes.

Les théories qui supposent une étape intermédiaire dans la transmission de l'information structurale de l'antigène à l'anticorps sont celles de *BURNET* (1941-1949-1956) et de *SCHWEET* et *OWEN* (1957). Il peut paraître paradoxal de classer sous le même titre (théories informatrices) les théories de *BURNET* et celles de *PAULING* et de *HAUROWITZ*. Pendant plus de dix ans, en effet, ces théories ont représenté, pratiquement seules, deux conceptions essentiellement différentes des problèmes immunologiques; alors que l'abord de *PAULING* et de *HAUROWITZ* était de nature chimique, *BURNET* a situé les problèmes dans un contexte biologique; les trois publications théoriques successives de cet auteur traduisent le retentissement sur ces problèmes de l'évolution rapide de nos connaissances sur la biosynthèse des protéines et sur l'induction enzymatique.

Il ne semble pas nécessaire d'envisager séparément les théories de *BURNET* (1946) et de *SCHWEET* et *OWEN*, les différences existant entre ces deux théories ne paraissant pas de nature à modifier leur signification par rapport aux faits que nous discutons. Dans un cas comme dans l'autre, le premier rôle joué par l'antigène est d'entraîner une modification, dans les cellules formatrices des globulines, soit de ribonucléoprotéines (*BURNET*), soit de l'acide désoxyribonucléique (*SCHWEET* et *OWEN*). Cette modification persistera après la disparition de l'antigène par suite de formation de répliques de ces acides nucléiques, devenus les supports de l'information. Dès lors, la présence

éventuelle de l'antigène dans l'organisme jouera le rôle d'un facteur déclenchant en activant la synthèse des anticorps par les centres formateurs constitués à la phase précédente et, peut-être, en déclenchant un processus de multiplication cellulaire avec différenciation morphologique. En des termes plus précis, *SCHWEET* et *OWEN* supposent que l'antigène joue secondairement le rôle d'un inducteur. Lorsqu'une souche bactérienne est, de par sa constitution génétique, susceptible d'effectuer la synthèse induite d'un enzyme, les caractéristiques de l'enzyme produit sont indépendantes de l'inducteur utilisé, c'est-à-dire que diverses molécules, synthétiques ou naturelles, substrats de l'enzyme ou non, mais présentant entre elles de grandes analogies de structure, déclenchent la synthèse d'un même type de protéines génétiquement déterminé. Dans les termes de nos expériences, l'injection de rappel effectuée avec un motif hapténique voisin de celui utilisé au cours de l'immunisation primaire devrait entraîner la production d'anticorps spécifiques du premier antigène, et c'est ce que nous avons observé. Nos premiers résultats (1956) avaient d'ailleurs été relatés par *SCHWEET* et *OWEN* à l'appui de cette hypothèse. Mais ce deuxième motif injecté a également entraîné la production, dans les délais de la réponse secondaire, d'anticorps qui lui sont exactement adaptés et ces théories ne permettent pas dans leur forme actuelle de rendre compte de ce fait.

Résumons cette discussion. Des trois faits expérimentaux envisagés, les trois combinaisons deux à deux sont chacune compatible avec un groupe de théories. Aucune théorie n'est compatible avec ces trois faits. Les théories sélectives permettent de prévoir l'apparition des deux types d'anticorps décelés au cours du rappel hétérologue, mais seraient infirmées par l'absence, dans un antisérum homologue, d'anticorps mieux adaptés à un antigène hétérologue qu'à l'antigène homologue. Les théories informatrices qui sont basées sur la stricte complémentarité de structure entre l'anticorps et l'antigène ne sont compatibles par contre, dans leurs formes actuelles, qu'avec l'existence de l'un ou de l'autre des types d'anticorps simultanément observés au cours du rappel hétérologue. Si les faits que nous avons décrits devaient être confirmés et généralisés, il apparaîtrait qu'aucune des théories actuellement proposée ne peut être considérée comme satisfaisante.

Cette conclusion négative nous autorise à faire une suggestion qui consiste essentiellement à combiner l'hypothèse de la capture de l'antigène par des anticorps cellulaires aux théories informatrices indirectes. L'hypothèse faite par *MONOD* et reprise par *PAPPENHEIMER*

explique comment l'antigène peut pénétrer plus rapidement dans les cellules; elle n'implique aucun mécanisme particulier pour la transmission de l'information. Supposons que ce mécanisme fasse intervenir comme intermédiaire, des acides nucléiques. Au moment de l'injection de rappel, l'antigène sera activement concentré dans les cellules possédant à leur surface ou à la périphérie de certains organites sub-cellulaires des anticorps liés à ces structures. L'antigène jouera alors son rôle d'inducteur et déclenchera l'expression de l'information antérieurement acquise. Mais de plus, l'antigène électivement concentré au lieu même de son action entraînera, beaucoup plus rapidement qu'au cours de la phase primaire, la modification des structures auto reproductrices qui sont susceptibles d'être marquées de son empreinte. Si cet antigène a une configuration très légèrement différente du premier antigène injecté, on doit voir apparaître des anticorps spécifiques de ce deuxième antigène dans des délais plus brefs et en quantité plus importante qu'au cours d'une réponse primaire. La quantité formée doit rester cependant notablement inférieure à celle qui résulterait de deux injections espacées du même antigène.

On pourrait d'ailleurs fort bien supposer que lors de l'injection primaire, ce rôle de transporteur soit joué par des molécules qui ne présentent pour l'antigène que des affinités très faibles et qui seraient en petit nombre, c'est-à-dire des analogues cellulaires des anticorps naturels tels que *JERNE* les a envisagés. En l'absence d'un phénomène de capture, si rudimentaire qu'il soit au début de l'immunisation, l'antigène ne pourrait exercer son action qu'à la suite d'un processus de diffusion nécessairement lent. Or la plupart des antigènes sont rapidement dégradés dans l'organisme; ils peuvent également être inclus dans les structures cellulaires sans potentialités immunitaires. En dépendant de la seule diffusion pour atteindre les centres formateurs d'anticorps, l'antigène peut ne déclencher aucune réaction détectable.

L'absence ou le blocage des structures responsables de la capture d'un antigène donné, doit entraîner l'abolition spécifique de la réponse immunitaire : comme les théories de *JERNE* et de *BURNET* auxquelles nous avons emprunté beaucoup d'éléments (« Unités de reconnaissance » de *BURNET*), ce schéma permet d'envisager une explication du phénomène de tolérance immunitaire.

Nous reconnaissons la complexité du mécanisme que nous venons de proposer. Dans la mesure où nos résultats semblent en contradiction avec les théories sélectives, l'observation d'un effet de mémoire nous oriente vers les théories informatrices indirectes et, grâce à l'hypothèse de la « capture » de l'antigène, il est possible de rendre compte de tous

les faits observés. Mais le phénomène immunitaire, quelle que soit son individualité, ne peut être envisagé indépendamment des connaissances acquises dans les domaines si voisins de l'induction enzymatique et de la biosynthèse des protéines. A cet égard, le postulat fondamental des théories informatrices est en contradiction avec les conceptions généralement adoptées et énoncées par *CRICK* (1958) sous forme de « dogme » : « les protéines ne transmettent pas l'information structurale qu'elles ont reçue ».

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER, J., 1932, Some intracellular aspects of life and disease, *Protoplasma*, **14**, 296-306.
- ARMAND, Y., 1939, Rapports entre la spécificité sérologique et la constitution chimique de quelques antigènes, *Thèse de Sciences*, Paris, Hermann et Cie Edit.
- BARR, M. et GLENNY, A.T., 1945, Some practical applications of immunological principles, *J. Hyg.*, **44**, 135.
- BIELING, R., 1919, Untersuchungen über die veränderte Agglutininbildung mit Ruhrbacillen vorbehandelter Kannichen, *Ztschr. Immunol.*, **28**, 246-280.
- BORDUAS, A.G. et GRABAR, P., 1953, L'hémagglutination passive dans la recherche des anticorps antiprotéiques, *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 903-923.
- BOYD, W. et HOOKER, S., 1934, Some analyses of azoproteins, casein, gelatin and zein coupled with arsanilic acid, *J. Biol. Chem.*, **CIV**, 329.
- BOYDEN, S.V., 1951, The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera, *J. Exptl. Med.*, **93**, 107-120.
- BREINL, F. et HAUROWITZ, F., 1930, Chemische Untersuchungen des Präzipitates aus Hämoglobin und Anti-Hämoglobin-serum und Bemerkungen über die Natur der Antikörper, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **192**, 45-57.
- BURNET, F.M., 1941, The production of antibodies, Mac Millan and Co. Ltd. Edit., Melbourne.
- BURNET, F.M., et FENNER, F., 1949, The production of antibodies, 2ème édit., Mac Millan and Co. Ltd. Edit., Melbourne.
- BURNET, F.M., 1956, Enzyme, antigen and virus, *Cambridge Univ. Press*.

- BURNET, F.M., 1957, A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection, *Austr. J. of Science*, **20**, 67.
- BUSSARD, A., CORVAZIER, P., GRABAR, P. et ASCHKENASY, A., 1950, Modification des taux de protéines et d'anticorps sériques après injection d'extrait cortico-surrénal chez le rat, *Rev. d'Hématol.*, **5**, 130-147.
- CAMPBELL, D.H., LUESCHER, E. et LERMAN, L.S., 1951, Immunologic adsorbents. I. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen, *Proc. U.S. Natl. Acad. Sci.*, **37**, 575-578.
- CARSTEN, M.E. et EISEN, H.N., 1955, The specific interaction of some dinitrobenzenes with rabbit antibody to dinitrophenyl-bovine γ -globulin, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1273-77.
- CHASE, M.W. et WAGER, O.A., 1957, Quantity and quality of diphtheria antitoxin appearing after transfer of cells taken from immunized rabbits, *Fed. Proc.*, **16**, 639.
- CINADER, B. et DUBERT, J.M., 1955, Acquired immune tolerance to human albumin and the response to subsequent injections of diazo human albumin, *Brit. J. Exptl., Path.*, **36**, 515-529.
- CINADER, B. et DUBERT, J.M., 1956, Specific inhibition of response to purified protein antigens, *Proc. Royal Soc. B*, **146**, 18-33.
- CINADER, B. et PEARCE, J.H., 1958, The specificity of acquired tolerance to azoproteins, *Brit. J. Exptl., Path.*, **39**, 8-29.
- COHEN, G.N. et MONOD, J., 1957, Bacterial permeases, *Bact. Rev.*, **21**, 169-194.
- COHN, M. et PAPPENHEIMER, A.M., 1949, A quantitative study of the diphtheria toxin-antitoxin reaction in the sera of various species including man, *J. Immunol.*, **63**, 291-312.
- COHN, M. et MONOD, J., 1951, Purification et propriétés de la β -galactosidase (Lactase) d'*Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, 153-174.
- COHN, M., 1957, Contributions of studies on the β -galactosidase of *E. coli* to our understanding of enzyme synthesis, *Bact. Rev.*, **21**, 140-168.
- COONS, A.H., LEDUC, E.H. et CONNOLLY, J.M., 1955, Studies on antibody production, *J. Exptl. Med.*, **102**, 49-60 et 61-72.
- CRAMPTON, C.F., HAUROWITZ, F. et RELLER, H.H., 1952, Persistence of ^{14}C -anthranil-azo-ovalbumin in injected rabbits, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **80**, 448-451.
- CRICK, F.H.C., 1958, On protein synthesis, in *Symposia of the Soc. for exptl. Biol.*, N° XII, The biological replication of macromolecules, *Cambridge Univ. Press*, 138-163.

- DAVENPORT, F.M., HENNESSY, A.V. et FRANCIS, Th. Jr., 1953, Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antibody to antigenic variants of influenza virus, *J. Exptl. Med.*, **98**, 641-655.
- DAVENPORT, F.M. et HENNESSY, A.V., 1956, A serologic recapitulation of past experiences with influenza A; antibody response to monovalent vaccine, *J. Exptl. Med.*, **104**, 85.
- DIXON, F.J., BUKANTZ, S.C., DAMMIN, G.J. et TALMAGE, D.W., 1953, Fate of ^{131}I labelled bovine gamma globulin in rabbits, in The nature and significance of the antibody response, *Columbia Univ. Press*, New-York, 170-182.
- DIXON, F.J., MAURER, P.H. et DEICHMILLER, M.P., 1954, Primary and specific anamnestic antibody responses of rabbits to heterologous serum protein antigens, *J. of Immunol.*, **72**, 179-186.
- DIXON, F.J. et MAURER, P.H., 1955, Immunologic unresponsiveness induced by protein antigens, *J. Exptl. Med.*, **101**, 245-257.
- DIXON, F.J. et MAURER, P.H., 1955, Specificity of the secondary response to protein antigens, *J. Immunol.*, **74**, 418-431.
- DIXON, F.J., MAURER, P.H., WEIGLE, W.O. et DEICHMILLER, M.P., 1956, Rates of antibody synthesis during first, second and hyperimmune responses of rabbits to bovine gamma globulin, *J. Exptl. Med.*, **103**, 425-438.
- DIXON, F.J., 1957, Characterization of the antibody response, in Symposium on antibodies; their production and mechanism of action, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **50**, suppl. 1, 27-50.
- DOTY, P. et EPSTEIN, S.I., 1954, Direct observation of hapten-antibody equilibria, *Nature*, **174**, 89-90.
- DOUGHERTY, T.F., CHASE, J.H. et WHITE, A., 1944, Pituitary-adrenal cortical control of antibody release from lymphocytes. An explanation of the anamnestic response, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **57**, 295-298.
- DUBERT, J.M., GROS, P., COURSAGET, J. et MACHEBOEUF, M., 1953, Recherches diverses sur les anticorps effectuées grâce aux isotopes du carbone de masses atomiques 13 et 14, *J. Méd. de Bordeaux*, **130**, 303-309.
- DUBERT, J.M., 1956, Sur la nature de la réponse secondaire, *C. R. Acad. Sci.*, **243**, 1939-1941.
- DUBERT, J.M. et PARAF, A., 1957, Etude quantitative des conditions nécessaires à l'apparition d'un état de tolérance immunitaire, *C. R. Acad. Sci.*, **244**, 686-688.
- DUNGERN (Von), E., 1903, Die Antikörper, Resultate fruherer Forschungen und neue Versuche (Jena).

- EHRlich, P., 1900, On immunity with special reference to cell life, *Proc. Roy. Soc. S.B.*, **66**, 424-448 (*Croonian Lecture*).
- EISEN, H.N. et KARUSH, F., 1949, The interaction of purified antibody with homologous hapten, antibody, valence and binding constant, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 363-364.
- EISEN, H.N., CARSTEN, M.E. et BELMAN, S., 1954, Studies of hypersensitivity to low molecular weight substances. III. The 2,4-dinitrophenyl group as a determinant in the precipitin reaction, *J. Immunol.*, **73**, 298-308.
- FARR, R.S., 1956, Measurement of antigen-combining capacity of antisera as determined by ammonium sulfate precipitation of ^{131}I antigen after complex formation with antibody, *Fed. Proc.*, **15**, 586.
- FARR, R.S., 1957, A quantitative immunological measure of the primary interaction between IBSA and antibody, cité par TALMAGE, 1957, *Diversity of antibodies*.
- FELTON, L.D., 1949, The significance of antigen in animal tissue, *J. Immunol.*, **61**, 107.
- FREUND, J., et BONATO, M.V., 1944, The effect of paraffin, oil, lanolin-like substances and killed tubercle bacilli on immunization with diphtheric toxoid and *Bact. typhosum*, *J. Immunol.*, **48**, 325-334.
- FREUND, J., 1953, The response of immunized animals to specific and non specific stimuli, in *The nature and significance of the antibody response*, Columbia Univ. Press, New-York.
- GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A., 1953, Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin, *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 193-194.
- GRABAR, P., 1957, Quelques aspects nouveaux sur l'évolution de l'immunochimie, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, Suppl. 1, 3-10.
- GREEN, H. et ANKER, H.S., 1954, On the synthesis of antibody protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 365-373.
- GRIGNARD, V., DUPONT, G. et LOCQUIN, R., 1948, *Traité de Chimie Organique*, **15**, Masson et Cie Edit.
- HAUROWITZ, F. et BREINL, F., 1933, Recherches chimiques sur la combinaison spécifique de l'arsanil-albumine et de l'acide arsanique avec l'immunsérum (titre traduit), *Zeitschrift für Physiol. Chemie*, **214**, 111-120.
- HAUROWITZ, F., 1952, The mechanism of the immunological response, *Biol. Rev.*, **27**, 247.
- HAUROWITZ, F. et WALTER, H., 1955, Stability of an azoprotein hapten in the organism, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **88**, 67.

- HAUROWITZ, F., 1956, The nature of the protein molecule : problems of protein structure, *J. Cellular Comp. Physiol.*, **47**, suppl. 1, 1-16.
- HEIDELBERGER, M. et KENDALL, F.E., 1935, The quantitative theory of the precipitin reaction. III. The reaction between crystallin egg albumin and its homologous antigen, *J. Exptl. Med.*, **62**, 697.
- HEIDELBERGER, M., McLEOD, KAISER et ROBINSON, 1946, Antibody formation in volunteers following injection of pneumococci or their type-specific polysaccharides, *J. Exptl. Med.*, **83**, 303.
- HIGGINS, H.G. et DALLAS FRASER, 1952, The reaction of aminoacids and proteins with diazonium compounds, *Austr. J. of Scient. Research*, série A, **5**, 736-753.
- HOLT, L.B., 1949, Quantitative studies in diphtheria prophylaxis : the primary response, *Brit. J. Exptl. Path.*, **30**, 289.
- HUMPHREY, J.H. et PORTER, R.R., 1956, An investigation on rabbit antibodies by the use of partition chromatography, *Biochem. J.*, **62**, 93.
- HSIEH FU CHENG et HAUROWITZ, F., 1957, Incorporation of ^{35}S aminoacids into antibodies in primary and secondary response, *Fed. Proc.*, **16**, N° 1754.
- INGRAHAM, J.S., 1955, A subfraction from rabbit liver mitochondria which retains a high concentration of radioactivity from ^{35}S sulfanil azoproteins, *J. Inf. Dis.*, **96**, 129-132.
- JERNE, N.K., 1951, A study of avidity based on rabbit skin responses to diphtheria toxin-antitoxin mixtures, *Thèse de Sciences, Acta Pathol. et Microbiol. Scandinavica*, Suppl. LXXXVII.
- JERNE, N.K., 1955, The natural-selection theory of antibody formation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **41**, 849-857.
- JERNE, N.K. et AVEGNO, P., 1956, The development of the phage-inactivating properties of serum during the course of specific immunization of an animal. Reversible and irreversible inactivation, *J. Immunol.*, **76**, 200-208.
- JERNE, N.K., 1956, The presence in normal serum of specific antibody against bacteriophage T_4 and its increase during the earliest stages of immunization, *J. Immunol.*, **76**, 209-216.
- KABAT, E.A., 1956, Heterogeneity in extent of the combining regions of human antidextran, *J. Immunol.*, **77**, 377.
- KARUSH, F., 1956, The interaction of purified antibody with optically isomeric haptens, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5519-26.
- KEKWICK, R.A. et RECORD, B.R., 1941, Some physical properties of diphtheria antitoxic horse sera, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **22**, 29-44.
- LANDSTEINER, K. et Van der SCHEER, 1936, On gross reactions of immune sera to azoproteins, *J. Exptl. Med.*, **63**, 325-339.

- LANDSTEINER, K., 1945, The specificity of serological reactions, *Harvard Univ. Press*.
- LAPRESLE, Cl. et DURIEUX, J., 1957, Etude de la dégradation de la sérum albumine humaine par un extrait de rate de lapin. III. Modifications immunologiques de l'albumine en fonction du stade de dégradation, *Ann. Inst. Pasteur*, **92**, 62-73.
- LERMAN, L.S., 1953, Antibody chromatography on an immunologically specific adsorbent, *Nature*, **172**, 635-636.
- MACHEBOEUF, M., REBEYROTTE, P., DUBERT, J.M. et BRUNERIE, M., 1953, Microélectrophorèse sur papier avec évaporation continue du solvant (électrorhéophorèse), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 334-345 et 346-364.
- MARRACK, J. et SMITH, F.C., 1932, Quantitative aspects of immunity reactions : the combination of antibodies with simple haptens, *Brit. J. Exptl. Path.*, **13**, 394-402.
- MARRACK, J., HOCH, H. et JOHNS, R.G.S., 1951, The valency of antibodies, *Brit. J. Exptl. Path.*, **32**, 212-230.
- MAURER, P.H., 1954, The cross reactions between albumins of different species and gamma globulins of different species, *J. Immunol.*, **72**, 119-122.
- MELCHER, L.R., MASOUREDIS, S.P. et REED, R., 1953, The immunological relationship between human and bovine serum albumin, *J. Immunol.*, **70**, 125-128.
- MONOD, J., 1958, Antibodies and induced enzymes, in *Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states*, H.S. Lawrence Edit., New-York, Paul B. Hoeber Inc.
- MUDD, S., 1932, A hypothetical mechanism of antibody-formation, *J. Immunol.*, **23**, 423-427.
- NISONOFF, A. et PRESSMAN, D., 1957, The annular nitrogen of pyridine as a determinant of immunologic specificities, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5565-5572.
- NISONOFF, A. et PRESSMAN, D., 1958, Heterogeneity and average combining constants of antibodies from individual rabbits, *J. Immunol.*, **80**, 417-428.
- NISONOFF, A. et PRESSMAN, D., 1958, Heterogeneity of antibody sites in their relative combining affinities for structurally related haptens, *J. Immunol.*, **81**, 126.
- NOSSAL, G.J.V., 1958, Antibody production by single cells, *Brit. J. Exptl. Path.*, **39**, 544-551.
- NOVICK, A. et WEINER, M., 1957, Enzyme induction as an all or none phenomenon, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **43**, 353.
- PAPPENHEIMER, A.M., 1957, Hypersensitivity of the delayed type, *Harvey Lectures*, New-York Acad. Press.

- PAPPENHEIMER, A.M., MATTHEW SCHARFF, A.B. et UHR, J.W., 1958, Delayed hypersensitivity and its possible relation to antibody formation, sous presse.
- PAULING, L., 1940, A theory of the structure and process of formation of antibodies, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2643-2657.
- PAULING, L., PRESSMAN, D. et GROSSBERG, A.L., 1944, The serological properties of simple substances. VII. A quantitative theory of the inhibition by haptens of the precipitation of heterogeneous antisera with antigens, and comparison with experimental results for polyhaptenic simple substances and for azoproteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 784-792.
- PAULING, L., 1954, The duplication of molecules, in *Aspects of synthesis and order in growth*, Ed. D. Rudnick, *Princeton Univ. Press*, 3-13.
- PAULY, H., 1915, Zur Kenntnis der Diazoreaktion des Eiweisses, *Hoppe-Seylers Zeitschr. für Physiol. Chem.* **94**, 284.
- RELYVELD, E.H., 1958, Etudes sur la toxine et l'antitoxine diphtériques et la réaction toxine antitoxine, *Thèse de Sciences*, Paris.
- SANG, J.H. et SOBEY, W.R., 1954, The genetic control of response to antigenic stimuli, *J. Immunol.*, **72**, 52.
- SCATCHARD, G., 1949, The attractions of proteins for small molecules and ions, *Annals of the New York Acad. Sci.*, **51**, 660-673.
- SCHWEET, R.S. et OWEN, R.D., 1957, Concepts of protein synthesis in relation to antibody formation, *J. of Cell. and Comp. Physiol.*, **50**, suppl. 1, 199-228.
- SINGER, S.J. et CAMPBELL, D.H., 1955, Physical chemical studies of soluble antigen-antibody complexes. III. Thermodynamics of the reaction between bovine serum albumin and its rabbit antibodies, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3499-3510.
- SINGER, S.J. et CAMPBELL, D.H., 1955, Physical chemical studies of soluble antigen-antibody complexes. V. Thermodynamics of the reaction between ovalbumin and its rabbit antibodies, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4851-4855.
- SINGER, S.J., EGGMAN, L. et CAMPBELL, D.H., 1955, Physical chemical studies of soluble antigen-antibody complexes. VI. The effect of pH on the reaction between ovalbumin and its rabbit antibodies, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4855-4857.
- SINGER, S.J., 1957, Physical chemical studies on the nature of antigen-antibody reactions, *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **50**, suppl. 1, 51-78.
- STAUB, A.M., TINELLI, R., LUDERITZ, O. et WESTPHAL, O., 1959, Etude immunochimique sur les Salmonella. V. Rôle de quelques sucres et en particulier des 3-6 dideoxyhexoses dans la spécificité

- des antigènes 0 du tableau de Kauffmann-White, *Ann. Inst. Pasteur*, sous presse.
- STAVITSKY, A.B., 1954, Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells, *J. Immunol.*, **72**, 360-367.
- STAVITSKY, A.B., 1956, Mechanism of antibody synthesis by transplanted cells, *Fed. Proc.*, **15**, 615.
- STEVENS, K.M., 1956, Some considerations of the antigen dose-antibody response relationship, *J. Immunol.*, **76**, 187-191.
- TALIAFERRO, W.H. et TALIAFERRO, L.G., 1951, The role of the spleen in hemolysin production in rabbits receiving multiple antigen injections, *J. Inf. Dis.*, **89**, 143-168.
- TALIAFERRO, W.H. et TALMAGE, D.W., 1955, Absence of aminoacid incorporation into antibody during the induction period, *J. Inf. Dis.*, **97**, 88-98.
- TALIAFERRO, W.H., 1957, General introduction : synthesis and degradation of antibody, in Symposium on antibodies : their production and mechanism of action, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **50**, suppl. 1, 1-26.
- TALIAFERRO, W.H. et TALIAFERRO, L.G., 1957, Aminoacid incorporation into precipitin at different stages in the secondary response to bovine serum albumin, *J. Inf. Dis.*, **101**, 252-274.
- TALMAGE, D.W., FRETTER, G.G. et TALIAFERRO, W.H., 1956, The effect of repeated injections of sheep red cells on the hemolytic and combining capacities of rabbit antisera, *J. Inf. Dis.*, **98**, 293-299.
- TALMAGE, D.W., 1957, Diversity of antibodies in Symposium on antibodies : their production and mechanism of action, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **50**, suppl. 1, 229-246.
- TALMAGE, D.W., 1957, Allergy and immunology, *Ann. Rev. Med.*, **8**, 239-256.
- TOPLEY, W.W.C., 1930, The role of the spleen in the production of antibodies, *J. Pathol. and Bacteriol.*, **33**, 339.
- TREFOUEL, J., TREFOUEL, T.J., NITTI, F., BOVET, D. et HAMON, V., 1938, Rapport entre la vitesse de réduction des matières colorantes azoïques et leurs propriétés thérapeutiques, rapport présenté au 1er Congrès Intern. des Microbiologistes de Langue Française.
- WEIL, F. et FELIX, A., 1916, Über die Beziehungen der Gruber-Widalschen Reaktion zum Fleckfieber, *Wien. Klin. Wschr.*, **29**, 974.
- WHITE, R.G., 1958, Antibody production by single cells, *Nature*, **182**, 1383-1384.
- WURMSER, R., 1957, Etude thermodynamique des réactions immunologiques, *Expos. Ann. Biochim. Méd.*, 141-170.

TABLE DES MATIÈRES

Abréviations utilisées au cours de ce mémoire	10
Introduction	11
Chapitre I	
Principales caractéristiques du phénomène de rappel	15
Chapitre II	
Effets d'injections espacées de deux antigènes différents mais présentant entre eux des réactions croisées	27
Chapitre III	
Analyse par la méthode de dialyse à l'équilibre des anti- corps homologues d'un haptène donné	57
Chapitre IV	
Evolution des propriétés spécifiques des anticorps anti haptènes au cours de réactions de rappel homologues ou hétérologues	97
Chapitre V	
Conclusions et discussion générale	111
Bibliographie	125

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Déterminisme génétique de la structure des protéines.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 26 février 1959.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN SARRAILH.

Dépôt légal Editeur n° 3 du 1er trimestre 1959

Imprimé en France

